



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIHEMORRAGICA *in vitro* E *in vivo* DE *Brownea ariza* Benth”**

TESIS DE GRADO

**PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR: CRISTHIAN JONATHAN BRAVO ZAMBRANO

TUTOR: B.Q.F FAUSTO CONTERO BEDOYA

RIOBAMBA-ECUADOR

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIHEMORRAGICA *in vitro* E *in vivo* DE *Brownea ariza Benth***”, de responsabilidad del señor egresado Cristhian Jonathan Bravo Zambrano, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DECANA FAC. DE CIENCIAS	_____	_____
Dra. Ana Karina Albuja Landi DIRECTORA ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA	_____	_____
B.Q.F Fausto Contero Bedoya DIRECTOR DE TESIS	_____	_____
M.Sc. Diego Vinuesa Tapia MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
M.Sc. Karen Acosta MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____
Abgda. Bertha Quintanilla COORDINADOR SISBIB-ESPOCH	_____	_____
NOTA DE TESIS ESCRITA	_____	

Yo, **Cristhian Jonathan Bravo Zambrano**, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

CRISTHIAN JONATHAN BRAVO ZAMBRANO

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a Dios por ser mi guía, mi apoyo y mi fortaleza. A mi madre, mis hermanas y hermano, por ser mis ejemplos de paciencia, perseverancia y constancia. A mis tíos maternos y mi abuelito cuyas palabras me permitieron superar obstáculos y llevar a fin termino mi carrera y tesis.

Cristhian J. Bravo Z.

AGRADECIMIENTO

A la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO por abrirme las puertas y ser mi segundo hogar. A todos aquellos que fueron mis profesores durante mi carrera, los cuales me brindaron las herramientas necesarias para llevar a fin término la misma. A mi tutor B.Q.F Fausto Contero Bedoya y colaborador B.Q.F Diego Vinuesa M.Sc, que sin su paciencia, conocimientos, apoyo y entusiasmo no habría llevado a fin término en el presente trabajo de investigación. A mi familia, mis amigos y todos aquellos que estuvieron presentes a lo largo de mi carrera, quienes me brindaron su apoyo, ejemplo y cariño en todo momento.

Cristhian J. Bravo Z.

RESUMEN

Se realizó el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad antihemorrágica *in vitro* e *in vivo* de *Brownea ariza* Benth con el objeto de comprobar su actividad para detener y sanar hemorragias. Se procedió a recolectar la muestra, se la acondiciono y realizo el tamizaje fitoquímico, posteriormente se cualifico y cuantifico los compuestos de interés mediante espectrofotometría UV, espectrofotometría IR y cromatografía en capa fina TLC. Una vez concluido el estudio fitoquímico se procedió a realizar las pruebas de citotoxicidad, pruebas *in vitro* y las pruebas *in vivo*; todo esto mediante los ensayos de: letalidad sobre *Artemia salina* para citotoxicidad, tiempo de protrombina (TP) y tromboplastina (TTP) para las pruebas *in vitro* y tiempo de sangría para las pruebas *in vivo*. Con los datos obtenidos se determinó que *Brownea ariza* Benth posee compuestos de tipo fenólico de estructura muy semejante a la del ácido tánico y gálico, que sus extractos tienen la capacidad de formar coágulos de una manera muy rápida, siendo el hidrolizado el que presenta mayor citotoxicidad pero un tiempo más rápido en formar el coagulo a una concentración de 3.125 ppm. Con esto se comprueba que *Brownea ariza* Benth es útil para detener el sangrado en un tiempo muy corto, por lo cual se recomienda desarrollar nuevos medicamentos de uso tópico para heridas de tipo ulceroso como es el caso del pie diabético en la diabetes mellitus a partir de esta planta.

Palabras clave: <Sanar hemorragias> <Tamizaje fitoquímico > <Cualifico> <Cuantifico> <Espectrofotometría UV> <Espectrofotometría IR> <Cromatografía en capa fina TLC> <Citotoxicidad> <Pruebas *in vitro*> <Pruebas *in vivo*> <Tiempo de protrombina (TP) > <Tiempo de tromboplastina parcial (TTP)> <Tiempo de sangría> <Compuestos de tipo fenólico> <Formar coágulos> <Uso tópico> <Pie diabético>

SUMMARY

Study phytochemical and the anti-bleeding activity *in vitro* and *in vivo* Brownea assessment was conducted in order to check its activity to stop and heal bleeding. It was proceeded to collect the sample, was conditioned and perform the phytochemical screening, subsequently be qualified and quantified the compounds of interest using UV spectrophotometry, IR spectrophotometric, and chromatography in thin layer TLC. As soon as the study was concluded the phytochemical study was to perform tests of cytotoxicity, *in vitro* and *in vivo*; all this by testing: fatality on *Artemia salina* for cytotoxicity, prothrombin (PT) and thromboplastin (PTT) for the *in vitro* tests and bleeding time for *in vivo* testing. With the data obtained was determined that *Brownea ariza* Benth possesses compounds of type phenolic structure very similar to the tannic acid and gallic acid, which extracts has the ability to form clots rapidly in form the clot to a concentration of 3,125 ppm. This checks that *Brownea ariza* Benth is useful to stop bleeding in a very short time, so it is recommended to develop new medicines for topical for wounds of ulcerative type as it is the case of diabetic foot in a diabetes mellitus from this plant.

Key words: Heal bleeding, phytochemical screening, qualify, quantify, spectrophotometry UV, spectrophotometry IR, chromatography in thin layer (TLC), cytotoxicity, *in vitro* tests, *in vivo* tests, prothrombin time (PT), partial thromboplastin time (TTP), bleeding time, type phenolic compounds, form clots, topical use, diabetic foot.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE GRÁFICOS	x
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO	- 1 -
1.1. Brownea ariza Benth	- 1 -
1.2. Compuestos fenólicos.....	- 2 -
1.3. Taninos.....	- 2 -
1.3.1. Características comunes de los taninos.	- 3 -
1.3.2. Clasificación de los taninos.	- 3 -
1.3.3. Taninos no hidrosolubles o condensados.	- 5 -
1.3.4. Clasificación de los taninos por su origen.	- 6 -
1.3.5. Formación del tanino y su rol en los vegetales.	- 7 -
1.3.6. Funciones atribuidas en la planta.	- 7 -
1.3.7. Propiedades de los taninos en las plantas medicinales.....	- 8 -
1.4. Tamizaje fitoquímico	- 10 -
1.5. Espectrofotometría uv	- 11 -
1.6. Infrarrojo	- 12 -
1.7. Técnicas cromatográficas.	- 14 -
1.8. Citotoxicidad.....	- 14 -
1.9. Trastornos de la coagulación	- 14 -
1.9.1. Sistema hemostático-cascada de la coagulación.	- 14 -
1.9.2. Alteraciones hemorrágicas.	- 15 -
1.9.3. Alteraciones vasculares.	- 15 -
1.9.4. La púrpura trombótica trombocitopénica. y el síndrome hemolítico urémico.	- 16 -
1.9.5. Alteración en el número de plaquetas.....	- 16 -
1.9.6. Trombosis asociada a fármacos	- 18 -
1.9.7. Hemofilia.....	- 18 -
1.10. Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina (TTP)	- 19 -
1.10.1. Tiempo de protrombina (TP).	- 19 -
1.10.2. Tiempo de tromboplastina parcial (TTP).	- 20 -

1.11.	Tiempo de sangría	- 20 -
-------	-------------------------	--------

CAPITULO II

2.	PARTE EXPERIMENTAL	- 21 -
2.1.	Lugar	- 21 -
2.2.	Materiales, equipos y reactivos	- 22 -
2.2.1.	<i>Materiales</i>	- 22 -
2.2.2.	<i>Equipos</i>	- 23 -
2.2.3.	<i>Reactivos</i>	- 24 -
2.3.	Técnicas y métodos	- 25 -
2.3.1.	<i>Extracción y tamizaje fitoquímico</i>	- 25 -
2.3.2.	<i>Extractos para la cuantificación en uv e ir</i>	- 31 -
2.3.3.	<i>Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos en aguacalteu</i>	- 32 -
2.3.4.	<i>Determinación colorimétrica de taninos expresados como acido tánico</i>	- 33 -
2.3.5.	<i>Determinación colorimétrica de taninos expresados como acido gálico</i>	- 34 -
2.4.	Determinación del espectro infrarojo	- 34 -
2.4.1.	<i>Determinación de los picos del solvente (metanol)</i>	- 34 -
2.4.2.	<i>Determinación de los picos del ácido gálico en metanol</i>	- 35 -
2.4.3.	<i>Determinación de los picos del extracto en metanol</i>	- 35 -
2.4.4.	<i>Determinación de los picos del extracto hidrolizado disuelto en metanol</i>	- 35 -
2.5.	Cromatografía en capa fina (TLC)	- 35 -
2.6.	Citotoxicidad	- 36 -
2.7.	Tiempo de protrombina (tp) y tromboplastina (TTP)	- 36 -
2.7.1.	<i>Tiempo de protrombina (TP)</i>	- 36 -
2.7.2.	<i>Tiempo de tromboplastina (TTP)</i>	- 36 -
2.7.3.	<i>Tiempo de protrombina (TP) empleando el extracto hidrolizado y el no hidrolizado</i>	- 37 -
2.7.4.	<i>Tiempo de tromboplastina (TTP) empleando el extracto hidrolizado y el no hidrolizado</i>	- 37 -
2.8.	Tiempo de sangría	- 37 -

CAPITULO III

3.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS	- 39 -
3.1.	Tamizaje fitoquímico	- 39 -
3.2.	Cuantificación de fenoles, acido tánico y gálico	- 41 -
3.2.1.	<i>Cuantificación de compuestos fenólicos expresada como fenol</i>	- 41 -
3.2.2.	<i>Cuantificación de taninos expresada como acido tánico</i>	- 44 -
3.2.3.	<i>Cuantificación de taninos expresada como acido gálico</i>	- 47 -
3.2.4.	<i>Evaluación de los solventes (exhaustividad de extracción)</i>	- 49 -

3.3.	Barrido inteligente de los extractos	- 50 -
3.3.1.	<i>Extracto metanolico:</i>	- 50 -
3.3.2.	<i>Extracto etanolico</i>	- 51 -
3.3.3.	<i>Extracto metanol/agua (1-1)</i>	- 51 -
3.3.4.	<i>Extracto acuoso:</i>	- 52 -
3.3.5.	<i>Extracto etanol/agua (1-1)</i>	- 52 -
3.4.	Pruebas del tamizaje para el extracto no hidrolizado	- 53 -
3.5.	Pruebas del tamizaje para el extracto hidrolizado	- 53 -
3.6.	Cromatografía en capa fina	- 54 -
3.7.	Espectro infrarrojo	- 55 -
3.7.1.	<i>Numero de onda y transmitancia del metanol</i>	- 55 -
3.7.2.	<i>Numero de onda y transmitancia del ácido gálico</i>	- 56 -
3.7.3.	<i>Numero de onda y transmitancia del extracto metanolico</i>	- 58 -
3.7.4.	<i>Numero de onda y transmitancia del extracto hidrolizado</i>	- 59 -
3.7.5.	<i>Comparación de los números de onda encontrados en el metanol, acido galico en metanol, extractos metanolico e hidrolizado</i>	- 60 -
3.7.6.	<i>Comparación de los números de onda encontrados en el acido galico en metanol, extractos metanolico e hidrolizado.</i>	- 61 -
3.8.	Ensayo de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i>:	63
3.9.	Tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina	65
3.9.1.	<i>Tiempo de protrombina TP</i>	65
3.9.2.	<i>Tiempo de protrombina con el extracto no hidrolizado</i>	66
3.9.3.	<i>Tiempo de protrombina con el extracto hidrolizado</i>	67
3.9.4.	<i>Tiempo de tromboplastina TTP</i>	69
3.9.5.	<i>Tiempo de tromboplastina con el extracto no hidrolizado</i>	70
3.9.6.	<i>Tiempo de tromboplastina con el extracto hidrolizado</i>	71
3.10.	Tiempo de sangría	73
3.10.1.	<i>Comparación de los valores obtenidos en el tiempo de sangría</i>	77
	CONCLUSIONES	78
	RECOMENDACIONES	80
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A.G	=	Ácido Gálico.
A.T	=	Ácido Tánico.
°C	=	Grados Celsius.
Cm	=	Centímetros.
cm⁻¹	=	Número de onda
%T	=	Transmitancia
AG	=	Ácido Gálico.
g	=	Gramos.
L	=	Litros.
mg/L	=	Miligramos por litro.
Mg	=	Miligramos.
MS	=	Muestra Seca.
Min	=	Minutos.
I.R	=	Infrarrojo
U.V	=	Visible
TLC	=	Cromatografía en capa fina
mL	=	Mililitros.
mm	=	Milímetro.
N	=	Normal.
Nm	=	Nanómetro.
µg	=	Microgramos
pH	=	Potencial Hidrogeno
%	=	Porcentaje
M	=	Molaridad
S	=	Segundos

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2- 1 Materiales empleados en el trabajo de titulación “estudio fitoquímico y evaluación de la actividad in vitro e in vivo de los extractos de Brownea ariza BENTH. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 22 -
Cuadro 2- 2 Equipos empleados en el trabajo de titulación “estudio fitoquímico y evaluación de la actividad in vitro e in vivo de los extractos de Brownea ariza BENTH. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.	- 23 -
Cuadro 2- 3 Reactivos empleados en el trabajo de titulación “Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad in vitro e in vivo de los extractos de Brownea ariza Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.	- 24 -
Cuadro 2- 4 Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos en agua mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.	- 32 -
Cuadro 2- 5 Determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 33 -
Cuadro 2- 6 Determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 34 -
Cuadro 3- 1 Características de los extractos de Brownea ariza Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 39 -
Cuadro 3- 2 Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de Brownea ariza Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 40 -
Cuadro 3- 3 Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de Brownea ariza Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 40 -

Cuadro 3- 4 Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de Brownea ariza Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 41 -
Cuadro 3- 5 Curva de calibración de fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 41 -
Cuadro 3- 6 Absorbancias de los extractos expresados como fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 43 -
Cuadro 3- 7 Concentración de los extractos expresados como fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 43 -
Cuadro 3- 8 Curva de calibración de ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 44 -
Cuadro 3- 9 Absorbancias de los extractos expresados como ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 45 -
Cuadro 3- 10 Concentración de los extractos expresados como ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 46 -
Cuadro 3- 11 Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 47 -
Cuadro 3- 12 Absorbancias de los extractos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 48 -
Cuadro 3- 13 Concentración de los extractos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 48 -

Cuadro 3- 14 Exhaustividad de extracción por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 49 -
Cuadro 3- 15 Tamizaje fitoquímico al extracto no hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 53 -
Cuadro 3- 16 Tamizaje fitoquímico al extracto hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 53 -
Cuadro 3- 17 Rf de los estándares de ácido tánico, gálico y los extractos: no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 55 -
Cuadro 3- 18 Número de onda y transmitancia del metanol. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 55 -
Cuadro 3- 19 Número de onda y transmitancia del ácido gálico en metanol. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 56 -
Cuadro 3- 20 Número de onda y transmitancia del extracto metanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 58 -
Cuadro 3- 21 Número de onda y transmitancia del extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 59 -
Cuadro 3- 22 Comparación entre los números de onda encontrados en el metanol, ácido gálico en metanol, extracto metanólico e hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 60 -
Cuadro 3- 23 Comparación entre los números de onda encontrados en el ácido gálico y los extractos metanólico e hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 61 -
Cuadro 3- 24 Valores del número de muertes ocasionadas por el medio salino y el metanol. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	63

Cuadro 3- 25 Valores del número de muertes ocasionadas por extracto no hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	63
Cuadro 3- 26 Valores del número de muertes ocasionadas por extracto hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	64
Cuadro 3- 27 Comparación de las DL ₅₀ del extracto no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	64
Cuadro 3- 28 Valores del tiempo de protrombina de los plasmas. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	65
Cuadro 3- 29 Valores promedio del tiempo de protrombina de los plasmas empleando el extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	66
Cuadro 3- 30 Valores promedio del tiempo de protrombina de los plasmas empleando el extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	67
Cuadro 3- 31 Valores del tiempo de tromboplastina de los plasmas. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	69
Cuadro 3- 32. Valores promedio del tiempo de tromboplastina de los plasmas empleando el extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	70
Cuadro 3- 33 Valores promedio del tiempo de tromboplastina de los plasmas empleando el extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	71
Cuadro 3- 34 Comparación de los valores de TP y TTP del extracto no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	73
Cuadro 3- 35 Tiempos de sangría (normal y extracto no hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014.....	74

Cuadro 3- 36 Tiempos de sangría (normal y extracto hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014.....	75
Cuadro 3- 37 Comparación de los valores obtenidos en el tiempo de sangría para los extractos no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014.....	77

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfica 3- 1 Curva de calibración de fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 42 -
Gráfica 3- 2 Barras de la concentración de fenol por el método de Folin-Ciocalteu.	- 44 -
Gráfica 3- 3 Curva de calibración de ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 45 -
Gráfica 3- 4 Barras de la concentración de ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 46 -
Gráfica 3- 5 Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 47 -
Gráfica 3- 6 Barras de la concentración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 49 -
Gráfica 3- 7 Barrido inteligente del extracto metanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 50 -
Gráfica 3- 8 Barrido inteligente del extracto etanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 51 -
Gráfica 3- 9 Barrido inteligente del extracto metanol/agua (1-1). Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 51 -
Gráfica 3- 10 Barrido inteligente del extracto acuoso. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 52 -
Gráfica 3- 11 Barrido inteligente del etanol/agua (1-1). Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 52 -
Gráfica 3- 12 Espectro infrarrojo del metanol. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 56 -

Gráfica 3- 13 Espectro infrarrojo del ácido gálico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	- 57 -
Gráfica 3- 14 Espectro infrarrojo del extracto metanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 59 -
Gráfica 3- 15 Espectro infrarrojo del extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	- 60 -
Gráfica 3- 16 Comparación entre los números de onda del ácido gálico, extracto metanólico e hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	62
Gráfica 3- 17 Valores normales de TP de los plasmas, reactivo de TP pasific hemostasis. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	65
Gráfica 3- 18 Valores promedio de TP de los plasmas, extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	67
Gráfica 3- 19 Valores promedio de TP de los plasmas, extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	68
Gráfica 3- 20 Valores normales de TTP de los plasmas, reactivo de TTP Pasific hemostasis. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	69
Gráfica 3- 21 Valores promedio de TTP de los plasmas, extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	71
Gráfica 3- 22 Valores promedio de TTP de los plasmas, extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	72
Gráfica 3- 23 Comparación de los valores de TP y TTP del extracto no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.....	73
Gráfica 3- 24 Tiempos de sangría (normal y extracto no hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014.....	75

Gráfica 3- 25	Tiempos de sangría (normal y extracto hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014	76
----------------------	---	----

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1- 1 Clasificación científica de Brownea ariza Beth.....	1 -
Ilustración 1- 2 Taninos hidrosolubles o pirogálicos	4 -
Ilustración 1- 3 Estructura de tanino de tara	5 -
Ilustración 1- 4 Estructura de flavan- 3,4-diol.....	6 -
Ilustración 1- 5 Localización de las regiones del visible	11 -
Ilustración 1- 6 Partes de un espectro UV	11 -
Ilustración 1- 7 Cascada de la coagulación.....	15 -
Ilustración 1- 8 Herencia ligada al sexo de la hemofilia (x*: cromosoma afecto).....	19 -
Ilustración 2- 1 Ubicación del cantón lago agrio.....	21 -
Ilustración 2- 2 Ubicación de la parroquia el Dureno del cantón lago agrio	21 -
Ilustración 2- 3 Proceso de obtención de los extractos para el tamizaje fitoquímico	26 -
Ilustración 3- 1 TLC de los extractos: no hidrolizado e hidrolizado y los estándares de ácido tánico, gálico revelados con vainillina/H ₂ SO ₄ . Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	54 -
Ilustración 3- 2 TLC de los extractos: no hidrolizado e hidrolizado y los estándares de ácido tánico, gálico revelados con FECL ₃ /HCL. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014	54 -
Ilustración 3- 3 Anova de un Factor, Comparaciones Múltiples	66
Ilustración 3- 4 Anova un factor, Comparaciones Múltiples.....	68

Ilustración 3- 5 Anova un factor, Comparaciones Múltiples	70
Ilustración 3- 6 Anova un Factor, Comparaciones Múltiples	72
Ilustración 3- 7 Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples	74
Ilustración 3- 8 Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples	76

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Materias primas	83
Anexo B: Recolección de materias primas y conocimientos ancestrales	83
Anexo C: Tamizaje fitoquímico	83
Anexo D: Tamizaje fitoquímico, prueba para saponinas positiva	84
Anexo E: Tamizaje fitoquímico, fenoles y taninos positivos, pruebas para alcaloides negativos	84
Anexo F: Prueba para lactonas y quinonas positiva	84
Anexo G: Prueba para antocianidinas positiva	85
Anexo H: Elaboración del reactivo de Folin-Ciocalteu	85
Anexo I: Cromatografías en capa fina (TLC)	85
Anexo J: Pruebas positivas para flavonoides, saponinas y taninos en el extracto no hidrolizado	86
Anexo K: Pruebas negativas para flavonoides y saponinas, positiva para taninos en el extracto hidrolizado	86
Anexo L: Espectrofotometría infrarroja	86
Anexo M: Pruebas de citotoxicidad en <i>Artemia salina</i>	87
Anexo N: Tiempos de protrombina (TP) y tromboplastina (TTP)	87
Anexo O: Centrifuga y baño maría para la determinación de TP' y TTP	87
Anexo P: Pipetas automáticas y diluciones para las pruebas de TP y TTP	88

INTRODUCCIÓN

Nuestro país posee una gran biodiversidad animal y vegetal. En nuestra región amazónica podemos encontrar plantas con un gran potencial para el desarrollo de nuevos medicamentos, el mismo que no solo permitirá beneficiar a aquellas personas que sufren alguna dolencia, sino también a aquellas comunidades en las que este tipo de plantas medicinales se desarrolla, además de estar rescatando aquellos conocimientos propios, ancestrales y muy autóctonos de nuestro país.

El presente trabajo permitirá desarrollar nuevos tratamientos para enfermedades relacionadas con los trastornos de la coagulación como es el caso de la hemofilia, el cual es un desorden hemorrágico, el mismo que es ocasionado por una anomalía en el cromosoma X, lo que conlleva a una disminución o en su caso ausencia de la funcionalidad de los factores VIII y IX de la cascada de coagulación, alrededor de un tercio de estas mutaciones no son por causas de tipo hereditario, sino más bien son espontaneas, la severidad de esta patología esta en dependencia de la situación, ya sea interna o externa y del órgano que se puede ver afectado. (GUIA DE TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA. 2011, p 9)

Durante estos años se ha demostrado que la hemofilia posee dos variables, la primera FVIII, la cual es provocada por la deficiencia o ausencia del factor VIII, también se la conoce como hemofilia A, por otra parte tenemos la hemofilia FIX la cual es provocada por la deficiencia o ausencia del factor IX de la coagulación, a la misma se la denomina hemofilia B. (GUIA DE TRATAMIENTO DE LA HEMOFILIA. 2011, p 11)

Investigaciones recientes nos demuestran que el tratamiento para la hemofilia podría enfocarse en el desarrollo de medicamentos obtenidos con proteínas humanas, como es el caso de la empresa OCTAPHARMA, la misma que ha iniciado una serie de ensayos clínicos de fase III con su nuevo factor VIII obtenido a partir de células humanas llamadas HUMAN-cl rhFVIII, el cual es un producto libre de materiales de origen animal o vegetal añadido. (FEDHEMO. 2012, p 5)

Existen muchas causas que pueden ocasionar una hemorragia, tal es el caso de los pacientes que sufren de diabetes, estudios demuestran que los altos niveles de glucosa en la sangre ocasionan que se pierda el control vasomotor y se incremente el flujo sanguíneo a la extremidad afectada, esto ocasionara la formación de fistulas arteriovenosas y una respuesta vasodilatadora como consecuencia de la hipertensión capilar ocasionada, con lo cual, la más mínima lesión puede desencadenar una severa hemorragia. Otra condición es la presencia de ulceraciones las cuales también por la misma condición de la enfermedad pueden ocasionar un sangrado difícil de detener. (ARANGO, G. 2014, p 5)

Estudios demuestran que *Brownea ariza* Benth posee actividad antihemorrágica, esto es demostrado en el trabajo “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD COAGULANTE DE *Brownea ariza* Benth” cuya autoría corresponde al Grupo de investigación fitoquímica del Departamento de biología de la Facultad de Educación y Ciencias de la Universidad de Sucre en el país de Colombia.

En este trabajo se demuestra que esta planta posee esta actividad, pero no se identifica cuáles son los componentes que otorgan dicha funcionalidad, mediante cromatografía de capa fina se encuentra que existen 5 fases, de las cuales la fase 5 y la 4 en los resultados nos demuestran que permiten la coagulación y que posiblemente en este proceso los iones calcio juegan un papel importante.

Por otra parte investigaciones han demostrado que *Brownea ariza* Benth posee en su extracto una cantidad apreciable de flavonoides, estos flavonoides han sido sometidos a purificación posteriormente se les ha realizado pruebas de citotoxicidad y evaluación de su actividad anticancerígena. Para las pruebas de citotoxicidad de estos flavonoides se ha empleado la línea celular VERO (células de riñón de mono verde: *Cercopithecus aethiops* encontrándose que poseen actividad antineoplásica. (GOMES, B. 2010, p 5).

El presente trabajo tiene como objetivos Identificar cualitativamente y cuantitativamente los metabolitos secundarios presentes, desarrollar el estudio de Citotoxicidad aguda y evaluar la actividad coagulante *in vitro* e *in vivo* de los sub-extractos de *Brownea ariza* Benth

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Brownea ariza* Benth

Ilustración 1- 1 Clasificación científica de *Brownea ariza* Beth



(VIVANCO MARQUÉS R, 2002)

“*Brownea ariza* Benth, incluida en las leguminales y en la familia Caesalpinaceae, es un árbol de copa redondeada de alrededor de 9 m de alto, cuyas hojas son alternas paripinnadas e inflorescencias en racimos semiesféricos que pueden ser axilares o terminales; la legumbre que presenta es comprimida de un largo de 14 a 18 cm, aproximadamente”. (VIVANCO, R. 2002, p 1)

“Es un árbol maderable que posee ciertas propiedades medicinales entre las cuales tenemos: Laxante, hemostática y muy utilizado durante procesos hemorrágicos internos, heridas en las cuales no para el sangrado”. (VIVANCO, R. 2002, p 3)

1.2. Compuestos fenólicos.

“Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, considerados metabolitos secundarios de las plantas, con diferentes estructuras químicas y actividad, englobando más de 8.000 compuestos distintos”. (LIEBM. 2011, p 5)

“Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias químicas que poseen un anillo aromático, un anillo benceno, con uno o más grupos hidróxidos incluyendo derivados funcionales (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.). La naturaleza de los polifenoles varía desde moléculas simples como los ácidos fenólicos hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos”. (LIEBM. 2011, p 6)

“Se presentan en las plantas en forma conjugada con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilos, aunque en algunos casos se pueden producir uniones directas entre una molécula de azúcar y un carbono aromático. Por ello la forma más común de encontrarlos en la naturaleza es en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos. Los azúcares asociados a los polifenoles pueden ser monosacáridos, disacáridos o incluso oligosacáridos”. (LIEBM. 2011, p 7)

“Los compuestos a los que se encuentran unidos con más frecuencia son: glucosa, galactosa, arabinosa, ramnosa, xilosa, y ácidos glucurónico y galacturónico. También pueden encontrarse unidos a ácidos carboxílicos, ácidos orgánicos, aminas, lípidos y a otros compuestos fenólicos”. (LIEBM. 2011, p 8)

1.3. Taninos.

“El nombre *tanino* se deriva del francés *tanin* y este del germánico *tan*, o *tanna*, que es el nombre con el cual los franceses designaban las cortezas de varios quercus empleadas para el curtido de pieles, según el farmacéutico Andrés Izaguirre (1908). No es fácil emitir una precisa definición de tanino, ya que este término engloba sustancias que están agrupadas químicamente. En todo caso, se define como cualquiera de los principios inmediatos vegetales, terciarios ($C_{76}H_{52}O_{46}$). Es una clase de compuestos fenólicos incoloros o amarillo-café”. (TINCTORIA. 2011, p 8)

1.3.1. *Características comunes de los taninos.*

“Compuestos químicos no cristalizables cuyas soluciones acuosas son coloidales, de reacción ácida y sabor astringente”.

- Precipitan con gelatina, albúmina y alcaloides en solución.
- Con sales férricas dan coloraciones negro azuladas o verdosas.
- Producen un color rojo intenso con ferricianuro de potasio y amoníaco.

“Precipitan a las proteínas en solución y se combinan con ellas, haciéndolas resistentes a las enzimas proteolíticas. Esta propiedad, denominada astringencia, fue mencionada anteriormente”. (TINCTORIA, 2011, p 8)

1.3.2. *Clasificación de los taninos.*

“Dado que estos compuestos se han investigado durante más de 100 años, se diseñaron diferentes clasificaciones de acuerdo con el nivel del conocimiento que de éstos se tenía en los diferentes periodos de tiempo. La clasificación de Freudenberg, que actualmente es empleada, tiene su fundamento en el tipo de estructura base del tanino. Es así que los agrupa en dos grandes clases: taninos hidrolizables y taninos condensados. Al igual se describirá la clasificación de los taninos según su origen”. (MEDIA, C. 2011, p 1)

1.3.2.1. *Taninos hidrolizables pirogálicos.*

“Los extractos tánicos hidrolizables o pirogálicos son aquellos que por hidrólisis en medio ácido y a ebullición forman productos solubles en agua”. (MEDIA, C. 2011, p 1)

“Su constitución está caracterizada por el hecho de que el núcleo bencénico está unido al segundo compuesto por intermedio de átomos de oxígeno (OH)”. (MEDIA, C. 2011, p 2)

“Depositán, habitualmente, ácido elágico (compuesto amarillento, cristalizado y poco soluble en agua) finamente dividido que forma en el fondo de las cubas y eflorescencias en el cuero. Con sales de hierro dan coloración negro-azulada”. (MEDIA, C. 2011, p 3)

Los extractos tánicos hidrolizables se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- Aquellos que forman ácido gálico y glucosa a través de hidrólisis llamados extractos gálicos
- Aquellos otros que dan ácido elágico y glucosa llamados extractos elágicos.

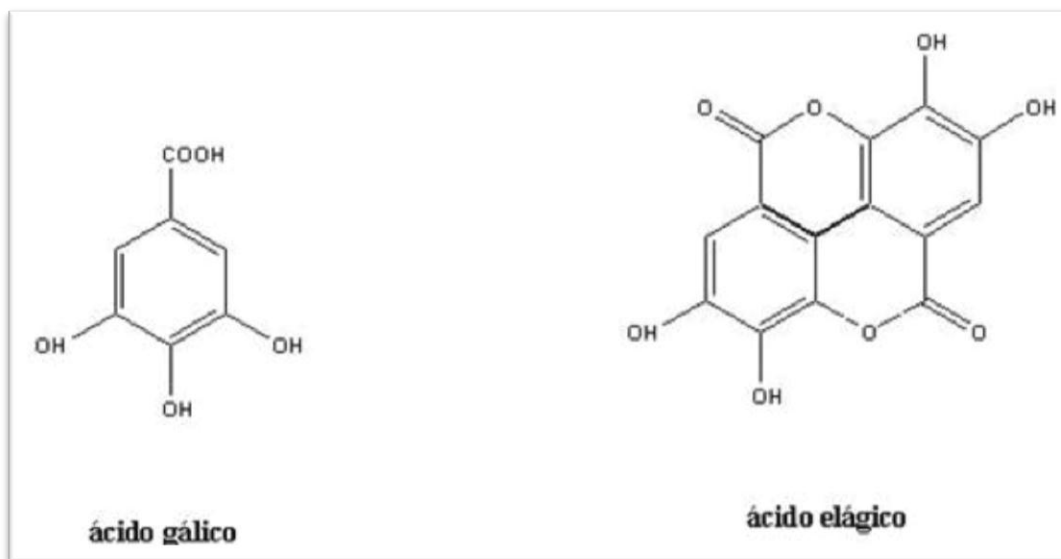
1.3.2.2. Características de taninos hidrosolubles o pirogálicos.

Se hidrolizan con facilidad por la acción de los ácidos, bases o enzimas, en un azúcar, un polialcohol y un ácido fenolcarboxílico. Dependiendo del tipo de ácido que produce por la reacción se subdividen en: galotaninos (ácido gálico) y elagitaninos (ácido elágico o dilactona estable del ácido hexahidroxidifénico)

Los 24 núcleos bencénicos están unidos por medio de átomos de oxígeno

- Dan coloración azul con FeCl₃.
- No precipitan con soluciones de Bromo.

Ilustración 1- 2 Taninos hidrosolubles o pirogálicos

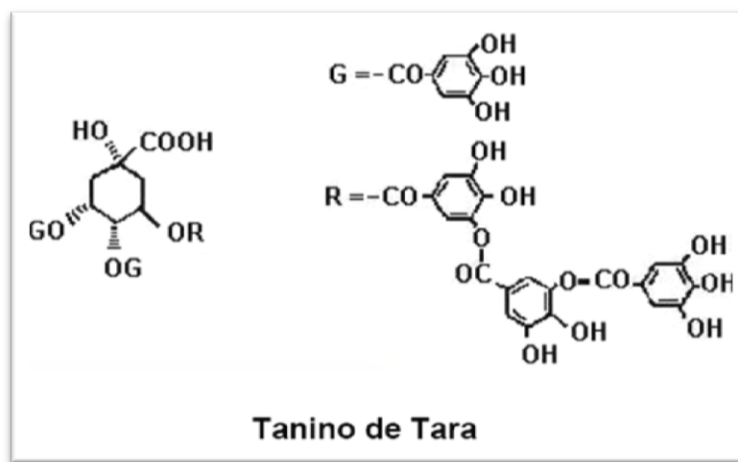


(MEDIA, 2011)

“Como ejemplos de taninos hidrolizables, del subgrupo de galotaninos podemos mencionar al que se obtiene de los frutos de *Caesalpinia spinosa* (nombre común: tara). Este tanino es fácilmente hidrolizable por la acción de la enzima tanasa. Esto permitió asignar la estructura de un éster poligaloílico del ácido químico a dicho tanino, con un peso molecular aproximado de 800. Es común,

también en las agallas del encino y en la raíz del zumaque. Dentro de los elagitánicos, podemos poner como ejemplo al corilagin, primer tanino aislado de este tipo, de *Caesalpinia coriarea* (nombre común: divi-divi) y *Terminalia chebula* (nombre común: mirabolano)". (MEDIA, C. 2011, p 4)

Ilustración 1- 3 Estructura de tanino de tara



(MEDIA, 2011)

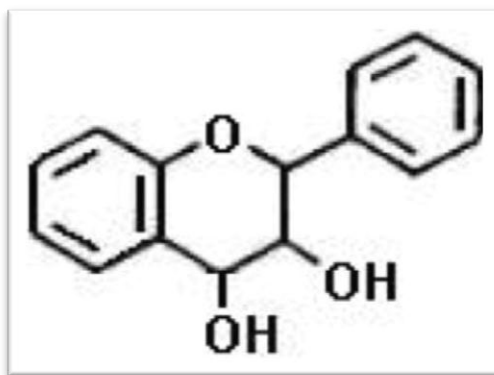
1.3.3. *Taninos no hidrosolubles o condensados.*

“Los extractos condensados o catequínicos que en las mismas condiciones forman precipitados. Sus núcleos constituyentes están reunidos entre sí con intervención de átomos de carbono. Se les llama catequínicos porque sometidos a destilación seca, casi todos, dan pirocatequina. Los taninos condensados son polímeros de flavan-3,4-dioles”. (MEDIA, C. 2011, p 5)

“Los taninos condensados presentes en leguminosas tropicales se encuentran en tres formas principales: (a) extractables (reactivos con proteína), (b) ligados a proteína, y (c) ligados a fibra. Existen leguminosas donde todos los taninos son extractables (e.g. *Acacia boliviana*) y en otras donde todos son ligados (e.g. *Gliricidia sepium*)”. (MEDIA, C. 2011, p 6)

“Por otra parte, se ha demostrado que el secado de una muestra puede afectar la distribución de taninos en el tejido de una planta. Por ejemplo, se ha observado que en varias leguminosas secadas al horno (60 °C) hubo una reducción de taninos extractables y un aumento de taninos ligados en comparación con muestras liofilizadas”. (MEDIA, C. 2011, p 7)

Ilustración 1- 4 Estructura de flavan- 3,4-diol



(MEDIA, 2011)

1.3.3.1. *Características de los taninos condensados.*

“Son derivados de unidades de flavan-3,4-dioles (leucoantocianidinas o proantocianidinas monómeras), conocidos actualmente también como proantocianidinas condensadas”. (MEDIA, C. 2011, p 7)

“Al ser tratados con ácidos en caliente, se origina una polimerización progresiva hasta dar taninos amorfos, llamados flobafenos o taninos rojos”. (MEDIA, C. 2011, p 7)

En ellos, los núcleos bencénicos están unidos por átomos de carbono (por ejemplo C-4 a C-8, C-4 a C-6).

- Dan coloración verde con FeCl_3 .
- Precipitan con soluciones de bromo.

1.3.4. *Clasificación de los taninos por su origen.*

Según Wagner, por el origen se dividen en:

- **Taninos fisiológicos.**

Son el resultado de las funciones metabólicas de la planta, es decir, que se encuentran normalmente en las plantas.

- **Taninos patológicos.**

Son una respuesta al ataque de insectos, ya sea por ovoposición o por picadura.

“Ejemplo de este tipo de taninos los encontramos en la corteza de mimosa (*Acacia mollissima Willd*), en la madera de quebracho (*Schinopsis lorenzii, Engl.*), en la corteza de mangle (*Rhizophora mangle*), en las hojas de lentisco (*Pistacia lentiscus*), en la madera del castaño (*Castanea sativa*), entre otros”. (MEDIA, C. 2011, p 9)

1.3.5. Formación del tanino y su rol en los vegetales.

“La formación del tanino en el vegetal estaría ligada a la función clorofiliana: fenómenos de fotosíntesis dependientes de la luz solar, la clorofila y el dióxido de carbono. Se constata en efecto que las partes del vegetal expuestas al sol son las más ricas en tanino. Se admite que los taninos se formarían por una transformación de los sacáridos que Producirían derivados cíclicos, los que sufrirían enseguida condensaciones y oxidaciones variables, pero cuyos detalles no son aún bien conocidos.” (MEDIA, C. 2011, p 9)

1.3.6. Funciones atribuidas en la planta.

Dentro de las funciones que desempeñan en la planta, se les atribuye, entre otras, las que a continuación se mencionan:

- Contribuyen a la formación del súber.
- Son imprescindibles en la formación de sustancias vegetales, como aceites esenciales, resinas, lignina, etc. (MEDIA, C. 2011, p 10)
- Juegan un papel protector, evitando el ataque de insectos y hongos, de allí que se le atribuya propiedades fungicidas y bacteriostáticas.
- Cumplen un papel moderador de los procesos de oxidación y de acciones anti fermentos.

“Se le considera sustancias de reserva, y por otro lado, materiales de desecho; en este último caso, luego de proteger a la planta en ciertas etapas del crecimiento, finalmente se destruyen o depositan como producto del metabolismo en ciertos tejidos muertos de la planta madura, como el súber externo, el leño y las agallas”. (MEDIA, C. 2011, p 10)

“Los tubérculos y los troncos ricos en tanino resisten largo tiempo a los fenómenos de putrefacción. En los fenómenos de germinación el tanino parece ser una sustancia de reserva. Parece verdadero que el

rol de un mismo tanino puede ser diferente según las condiciones en las cuales se encuentra la célula que lo contiene”. (MEDIA, C. 2011, p 10)

1.3.7. *Propiedades de los taninos en las plantas medicinales*

“Curación de heridas y cuidado de la piel: Los taninos cumplen una función cicatrizante al acelerar la curación de las heridas y hemostática, al detener el sangrado. La cicatrización se produce por la formación de las costras al unirse las proteínas con los taninos y crear un medio “seco” que impide el desarrollo de las bacterias. Al constreñir los vasos sanguíneos ayudan a la coagulación de la sangre y, por tanto, contribuyen a la curación de las heridas. La milenrama o el llantén, por ejemplo, son dos plantas que se utilizan con esta finalidad”. (MEDIA, C. 2011, p 11)

1.3.7.1. *Detención de la diarrea.*

“Por su acción astringente, (que contrae los tejidos seca las secreciones) resultan eficaces en el tratamiento de la diarrea, contribuyendo a que el organismo pueda realizar deposiciones más secas. Plantas que se utilizan para esta finalidad muy ricas en taninos son, por ejemplo, el algarrobo, la gayuba, el lentisco o los escaramujos de la rosa canina”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

1.3.7.2. *Antioxidantes.*

“Los taninos se consideran antioxidantes por su capacidad para eliminar los radicales libres, previniendo la aparición de numerosas enfermedades degenerativas, entre ellas el cáncer. Entre las plantas con propiedades antioxidantes muy ricas en taninos tenemos el té verde, el orégano”. (MEDIA, 2011)

1.3.7.3. *Antibacterianas.*

“La función antibacteriana de los taninos se produce fundamentalmente al privar a los microorganismos del medio apropiado para que puedan desarrollarse. El hipérico durante mucho tiempo fue llamado hierba militar por su capacidad para curar las heridas y prevenir sus infecciones. Podríamos considerar a esta planta como la penicilina del pasado de ahí que se la ha bautizado con el nombre de hierba de las heridas. La salvia o el aloe, etc. Sería más ejemplos de plantas que se utilizan por su contenido en taninos para que las heridas no se infecten”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

1.3.7.4. *Antídotos contra los venenos.*

“La capacidad que tienen estos principios de inhibir la absorción de los alimentos en el tubo digestivo es aprovechada, en caso de ingestión de productos venenosos, para impedir que los venenos entren en la corriente sanguínea. El ácido tánico se utiliza como contraveneno para precipitar las sustancias venenosas de los alcaloides y ciertas sales metálicas. Aunque la utilización de este componente por vía interna pueda producir síntomas gastrointestinales desagradables, su acción positiva en la neutralización de los venenos justifica su uso”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

1.3.7.5. *Colesterol.*

“Los taninos reducen el colesterol al inhibir su absorción y expulsarlo a través de las heces. Se ha comprobado una reducción de los niveles de colesterol “malo” (LDL) y triglicéridos y un aumento de “colesterol bueno” (HDL); al ingerir plantas ricas en este componente como la uva o el aceite de oliva”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

1.3.7.6. *Toxicidad de los taninos.*

“Las plantas medicinales que contienen taninos, utilizadas medicinalmente en las dosis adecuadas, proporcionan remedios adecuados para el tratamiento de muchas enfermedades. Sin embargo un uso inadecuado de plantas que contienen proporciones inadecuadas de estos componentes resulta tóxico”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

1.3.7.7. *Propiedades comunes de los taninos*

“A pesar de su constitución química muy variable, los taninos presentan un cierto número de propiedades comunes:

La mayor parte son compuestos incristalizables, de naturaleza coloidal y dotados de propiedades astringentes”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

- Son solubles en el agua y el alcohol; sus soluciones acuosas tienen carácter ligeramente ácido.
- Forman con las proteínas combinaciones insolubles e imputrescibles, particularidad que es usada en la industria de curtidos.

- Producen, en contacto con sales de hierro, combinaciones fuertemente coloreadas en azul o verde oscuros y más o menos solubles en agua.
- Sus soluciones son precipitados por muchas sales metálicas (hierro, cobre, plomo, estaño, mercurio, etc.) y forman compuestos pardos con soluciones de bicromato de potasio y ácido crómico.
- Sus soluciones son precipitados por diversas sustancias básicas tales como: colorantes orgánicos básicos, el agua de cal, el agua de barita, los alcaloides, etc.

“Las soluciones de tanino expuestas al aire absorben el oxígeno oxidándose, tomando rápidamente tintes oscuros y perdiendo parcialmente sus cualidades curtientes. La tendencia a la oxidación de los taninos se manifiesta cuando el pH sube por encima de 6”. (MEDIA, C. 2011, p 12)

1.4. Tamizaje fitoquímico

“Tamizaje En los países en vías de desarrollo el 80% de las terapias están dirigidas en base al uso de plantas medicinales. Por tanto, las plantas medicinales que se usan como materia prima para la producción de extractos o aislamiento de sustancias son parte de un estudio creciente y de gran potencial”. (SHARAPIN, N. 2000, p 1)

“Por otra parte, los factores endógenos que presenta una planta son variables de acuerdo a la edad y el desarrollo de la misma, sin olvidar que los metabolitos secundarios se encuentran distribuidos solo en ciertas partes u órganos, más no se encuentra de forma homogénea en todo el vegetal. Por lo cual, realizar un tamizaje fitoquímico nos permitirá establecer el sitio donde se halla mayor porcentaje de un metabolito secundario, además de saber la variedad de especies farmacológicamente activas presentes en la muestra que analicemos”. (SHARAPIN, N. 2000, p 1)

“Por ejemplo, las saponinas modifican la tensión superficial del estómago, los principios amargos llegan a aumentar el peristaltismo y los taninos al mezclarse con componentes activos pueden formar complejos que permiten una liberación gradual de un principio activo”. (SHARAPIN, N. 2000, p 1)

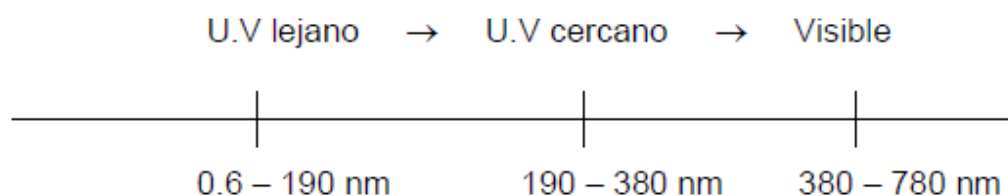
“Por lo tanto, la importancia del tamizaje fitoquímico está fundamentada en una serie de análisis cualitativos estandarizados que nos permitirán establecer de manera precoz qué grupos químicos o grupos farmacológicamente activos están presentes en una especie vegetal, además de orientar la investigación que se esté realizando”. (SHARAPIN, N. 2000, p 1)

1.5. Espectrofotometría UV

La espectroscopia UV-Visible estudia el fenómeno de adsorción de la radiación UV Visible de moléculas orgánicas e inorgánicas.

La región visible, a la que es sensible el ojo humano, se localiza entre los 380 y 780 nm.

Ilustración 1- 5 Localización de las regiones del visible



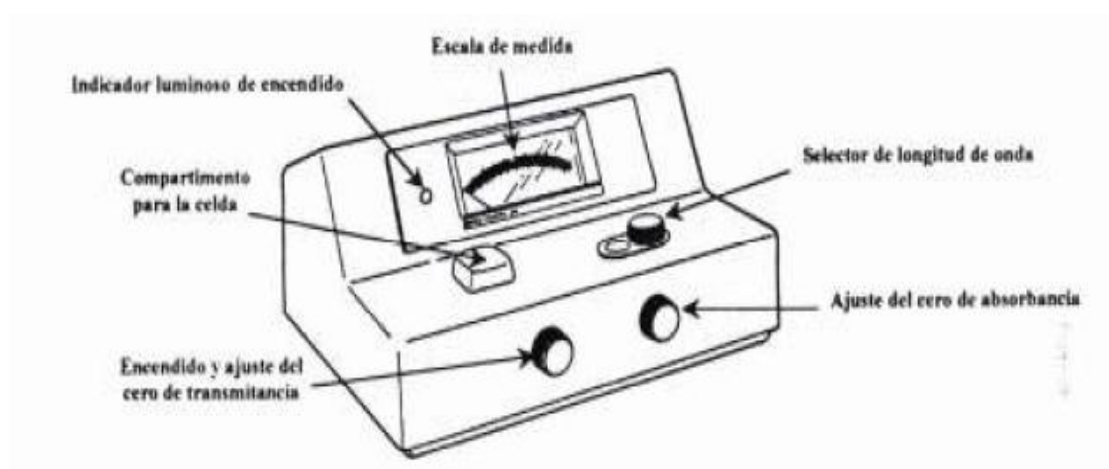
(MEEROW, 2010)

“La absorción de la radiación ultravioleta o visible por moléculas orgánicas e inorgánicas, generalmente se produce por la excitación de los electrones de enlace, por lo tanto, la longitud de onda de los máximos de absorción se puede relacionar con los enlaces de las especies absorbentes”.

(MEEROW, V. 2010, p 1)

“Los métodos espectroscópicos se basan en la capacidad de las sustancias de absorber (o emitir) radiación electromagnética. Éstos se pueden emplear para determinar la concentración de un reactivo o producto durante una reacción”. (MEEROW, V. 2010, p 1)

Ilustración 1- 6 Partes de un espectro UV



(MEEROW, 2010)

“El aparato detecta la cantidad de luz transmitida o absorbida a través de la solución en la celda y la compara con la que se transmite o absorbe a través de una solución de referencia denominada “blanco”. La lectura en la escala ya está convertida en absorbancia”. (MEEROW, V. 2010, p 1)

“La transmitancia de la muestra se define como la relación de la radiación transmitida y la incidente ($T = I / I_0$). La disminución de la intensidad de la radiación depende de la concentración del absorbente y de la longitud del camino recorrido por el haz. Estas relaciones se recogen en la Ley de Lambert-Beer-Bourger:

$$A = -\log T$$
$$A = \log (I / I_0) = (\epsilon \times b) \times c$$
$$\text{ABSORBANCIA} = (\epsilon \times b) \times c$$

Que establece una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, donde:

ϵ .- es la constante de proporcionalidad llamada coeficiente de absorción molar, absortividad molar o coeficiente de extinción ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Es la característica de una sustancia que nos dice cuánta luz absorbe a una longitud de onda determinada”. (MEEROW, V. 2010, p 1)

b.- es el paso óptico, anchura de la celda que contiene la muestra (cm).

c.- es la concentración de la especie de la cual estamos midiendo la absorbancia (M). (MEEROW, V. 2010, p 2)

“La ecuación mencionada es el fundamento de la espectrofotometría. La ley de Lambert-Beer Bourger se cumple para una radiación monocromática que atraviesa una disolución diluida ($\leq 0.01M$), cuando la especie absorbente no participa en un equilibrio que dependa de su concentración”. (MEEROW, V. 2010, p 2)

1.6. Infrarrojo

“La espectroscopia vibracional fue una de las primeras técnicas espectroscópicas que encontró un uso extendido, en particular la espectroscopia de absorción infrarroja (IR) que recibe su nombre de la región del espectro electromagnético implicada. Hay una segunda forma de espectroscopia vibracional (Raman) que se sustenta en un fundamento físico diferente y proporciona información similar y complementaria al IR. La región IR del espectro electromagnético se encuentra entre $12800\text{-}10 \text{ cm}^{-1}$.

Tanto desde el punto de vista de las aplicaciones como de los aparatos se puede dividir en tres zonas: IR cercano (NIR): $12800\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, IR medio: $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$; IR lejano: $400\text{--}10\text{ cm}^{-1}$, siendo en el IR medio donde se dan la mayoría de las aplicaciones analíticas tradicionales, aunque desde la década de los 80 la utilización del NIR ha experimentado un innegable auge. El NIR requiere una mínima o nula preparación de la muestra y ofrece un análisis cuantitativo sin consumir o destruir la muestra. Con frecuencia se combina con un espectrofotómetro Visible-Ultravioleta y dispositivos de fibra óptica para análisis remoto, encontrando especial interés en control de procesos”. (OLEAS, N. 2012, p 5)

“Por su parte el IR lejano requiere el uso de fuentes y materiales ópticos especiales. Es utilizado para el análisis de compuestos orgánicos, inorgánicos u organometálicos que contengan átomos pesados (masa atómica superior a 19) y proporciona información útil en estudios estructurales”. (OLEAS, N. 2012, p 5)

“Por lo que respecta al IR medio, existen espectrofotómetros comerciales desde 1940, aunque los avances más significativos en la técnica se produjeron con el desarrollo de instrumentos que incorporan el método de transformada de Fourier (FT-IR), que ha mejorado la calidad de los espectros y minimizado el tiempo requerido para la obtención de datos. Hoy en día, casi todos los instrumentos utilizados en espectroscopia infrarroja están equipados con sistema de análisis que utilizan transformadas de Fourier de haz sencillo”. (OLEAS, N. 2012, p 5)

“Una de las grandes ventajas de la espectroscopia IR es su versatilidad, ya que permite estudiar prácticamente cualquier muestra con independencia del estado en que se encuentre: líquidos, disoluciones, pastas, polvos, fibras, films, gases o superficies son algunos ejemplos”. (OLEAS, N. 2012, p 6)

“Como en otros procesos de absorción de radiación electromagnética, la interacción de la radiación infrarroja con la materia provoca en ésta alguna alteración. En el caso que nos ocupa, esta alteración guarda relación con cambios en el estado vibracional de las moléculas. El espectro vibracional de una molécula se considera una propiedad física única y por tanto característica de ésta molécula. Así, entre otras aplicaciones, el espectro IR se puede usar como “huella dactilar” en la identificación de muestras desconocidas mediante la comparación con espectros de referencia”. (OLEAS, N. 2012, p 6)

“Los espectros son a menudo complicados y resulta difícil asignar cada una de las bandas que aparecen en ellos a movimientos atómicos específicos. Esto no es siempre necesario para extraer información muy valiosa, de modo que el conocimiento “incompleto” de los espectros no disminuye su utilidad

para realizar análisis cuantitativos y cualitativos. De hecho, la espectroscopia IR junto a la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear, forman la base del análisis orgánico cualitativo contemporáneo centrado en la identificación de la estructura molecular de compuestos y mezclas desconocidas. También es cada vez mayor relevancia del IR en el campo del análisis cuantitativo, en el que la estimación de contaminantes atmosféricos provenientes de los procesos industriales ocupa un lugar relevante”. (OLEAS, N. 2012, p 6)

1.7. Técnicas cromatográficas.

“Las técnicas cromatográficas han permitido la separación, aislamiento, purificación e identificación de compuestos fenólicos, así como el estudio de la interacción entre los polifenoles y otros componentes de los alimentos. Las técnicas de cromatografía en papel y en capa fina, son empleadas para la purificación y aislamiento de compuestos fenólicos en los alimentos, sobre todo para la determinación de ácidos fenólicos”. (LIEBM, T. 2011, p 3)

1.8. Citotoxicidad

El ensayo de letalidad sobre *Artemia salina* es empleado para establecer si una sustancia es cito-tóxica. Cuando se investiga en particular extractos de plantas se podrían utilizar como punto de partida concentraciones desde los 31.25 ppm (partes por millón), en este tipo de ensayo 10 larvas son colocadas en tubos individuales los mismos que deben tener las soluciones a las concentraciones motivo del análisis, una vez transcurridas 24 horas son contabilizadas las sobrevivientes, Este tipo de ensayo debe realizarse por triplicado. (MCLAUGHLIN, et. al. 1991, p 8)

1.9. Trastornos de la coagulación

1.9.1. Sistema hemostático-cascada de la coagulación.

Es un sistema que se forma como una respuesta a una lesión, ya sea por acción del mismo vaso o a su vez por acción de la plaqueta, este proceso se inicia con la hemostasia primaria y finaliza con la activación del factor X de la coagulación.

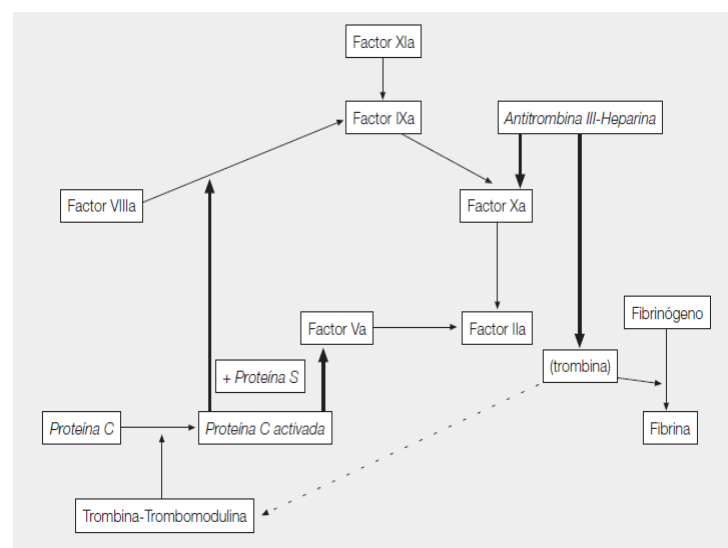
1.9.2. Alteraciones hemorrágicas.

Hematomas que lleguen a ocasionar un sangrado por horas o días, los cuales puedan ser producto de un hematoma u otra condición, se pueden considerar como una alteración a la hemostasia secundaria.

1.9.3. Alteraciones vasculares.

Por otro lado las purpuras secundarias son ocasionadas a una gran variedad de fármacos y estas manchas desaparecen al suspender el medicamento. (ROBLES, L. 2010, p 5)

Ilustración 1- 7 Cascada de la coagulación



(ROBLES PERA L., 2010)

1.9.4. *La púrpura trombótica trombocitopénica. (PTT) y el síndrome hemolítico urémico (SHU).*

Son dos tipos de síndromes muy poco frecuentes y no dependen de la edad del paciente, este tipo de alteraciones son muy semejantes, siendo la única diferencia que el (SHU) es más frecuente en niños que han tenido o sufrido infecciones por E. coli, por otro lado la (PTT) es más grave y por causas desconocidas y en ocasiones se asocia a ciertos fármacos, neoplasias y colagenosis (ROBLES, L. 2010, p 6)

1.9.5. *Alteración en el número de plaquetas*

1.9.5.1. *Consideramos trombopenia*

Se considera trombopenia a una cantidad inferior a 150 000/mm³, un valor inferior a 50 000/mm³ facilita el sangrado post traumático y un valor inferior a 20 000/mm³ ocasiona un sangrado espontaneo. (ROBLES, L. 2010, p 5)

1.9.5.2. *La púrpura trombocitopénica idiopática*

Es de tipo inmunológico, se da en el adulto como consecuencia de ciertos anticuerpos que destruyen antígenos estructurales plaquetarios. (ROBLES, L. 2010, p 6)

1.9.5.3. *La coagulación intravascular diseminada*

En esta patología se activa la coagulación por un factor tisular, la misma que no puede ser detenida, a consecuencia de esto se genera una isquemia por la formación de microtrombos y cierto sangrado por el consumo de plaquetas. (ROBLES, L. 2010, p 6)

1.9.5.4. *Las trombocitopatías congénitas*

No son comunes en población de tipo geriátrico, de estas trombopatías congénitas la más frecuente es la secundaria a fármacos, la cual ocasiona una disfunción de la síntesis de tromboexano, lo que conlleva a una alteración en la agregación plaquetaria, este tipo de medicamentos son el ácido acetil salicílico y los antiinflamatorios no esteroideos. (ROBLES, L. 2010, p 6)

Otro tipo de trombopatía adquirida puede ser a consecuencia de la insuficiencia renal por la acumulación de compuestos tóxicos, hepatopatías crónicas, lo cual conllevará a la disminución de los factores de coagulación. (ROBLES, L. 2010, p 7)

1.9.5.5. *El déficit antitrombina iii*

Es la falta de un anticoagulante llamado antitrombina III, este es sintetizado por el hígado, lo cual conlleva a una trombosis la misma que suele presentarse antes de los 60 años. (ROBLES, L. 2010, p 7)

1.9.5.6. *El déficit de proteína c activada.*

Esta proteína C activada inactiva los factores de la coagulación Va y VIIIa, al estar en bajas cantidades no detiene la coagulación y con ello la formación de trombos, es una patología genética que se manifiesta en la edad adulta, las probabilidades de tener una trombosis en la edad adulta a los portadores de este gen es de un 50%. (ROBLES, L. 2010, p 7)

1.9.5.7. *Protrombina G20210A.*

Es una mutación en los nucleótidos guanina-adenosina del gen de la protrombina, aquellos que presentan este tipo de mutación presentan protrombina plasmática en mayor cantidad, lo cual conlleva a la formación de trombos venosos. (ROBLES, L. 2010, p 8)

1.9.5.8. *Hiperhomocisteinemia.*

La elevación de los niveles normales de homocisteína es uno de los factores de riesgo para la aterosclerosis, dislipemia e hipertensión. (ROBLES, L. 2010, p 8)

1.9.5.9. *Trastornos mieloproliferativos.*

Hay cuatro tipos de este tipo de trastornos de los cuales la polisemia vera y la trombosis esencial pueden generar trombosis, para ello se recomienda disminuir el hematocrito a un 45%, el uso de la aspirina no está completamente comprobado. (ROBLES, L. 2010, p 8)

1.9.6. Trombosis asociada a fármacos

1.9.6.1. Trombocitopenia por heparina.

La incidencia de esta patología es baja, apenas con un 3%, esta aparece a los 5 o 10 días de una terapia con heparina. (ROBLES, L. 2010, p 9)

1.9.6.2. Necrosis cutánea por warfarina.

Esta patología se origina en el octavo día del tratamiento con warfarina, esto se debe a una trombosis de vénulas y capilares del tejido celular subcutáneo, este efecto adverso es más grave y común en pacientes con deficiencia de proteína C reactiva, a consecuencia de esta patología se forman petequias hemorrágicas, necrosis y exudado. (ROBLES, L. 2010, p 9)

1.9.6.3. Trombosis asociada a estrógenos.

Antes de cualquier tratamiento con estrógenos es importante reconocer que mediante el estudio de “HERS (Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study) se demostró su actividad protrombotica, es decir que este tratamiento facilita la formación de trombos. (ROBLES, L. 2010, p 9)

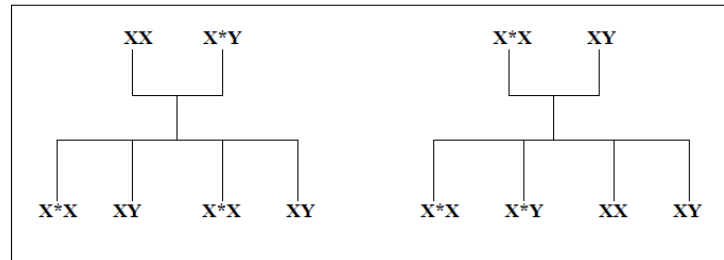
1.9.7. Hemofilia

La hemofilia es una patología de tipo genético la cual se encuentra ligada al sexo, consiste en una anomalía en la actividad del factor VIII (hemofilia A) y el factor IX (hemofilia B), de las cuales la más común es la hemofilia A. (ROBLES, L. 2010, p 10)

Herencia.- La hemofilia se encuentra ligada al cromosoma X, es por ello que las mujeres son las portadoras mientras que los hombres son los afectados, dicho de otra manera, las mujeres portadoras no son afectadas por la enfermedad, mientras que los hombres sí. (ROBLES, L. 2010, p 10)

En una pareja, cuando la mujer es portadora y el hombre no, sus hijos corren con un 50% de probabilidades de padecer la enfermedad. (ROBLES, L. 2010, p 10)

Ilustración 1- 8 Herencia ligada al sexo de la hemofilia (x*: cromosoma afecto)



(MARIA LUZ J., 2011)

Esta enfermedad se manifiesta durante mínimas agresiones las cuales generan hemorragias, esto puede afectar al sistema nervioso, músculos, órganos y articulaciones. (MARIA, J. 2011, p 2)

Las hemorragias más frecuentes son producidas con una mayor incidencia en las articulaciones, lo que puede desencadenar en hematomas con síntomas y signos semejantes al de una apendicitis. (MARIA, J. 2011, p 2)

El déficit de estos factores permite poder clasificar a la hemofilia en:

- Grave: si el factor se encuentra en un 1%.
- Moderada: si el factor se encuentra en un 1-5%.
- Leve: si el factor se encuentra en un 5-40%

1.10. Tiempo de protrombina (TP) y tiempo de tromboplastina parcial (TTP)

No se puede medir las etapas de la coagulación de una manera unitaria, sobretodo en la etapa dos, en la cual la protrombina se convierte en trombina, todo esto mediante la ayuda de la tromboplastina y los iones calcio. Todo esto culminando con el paso de fibrinógeno a fibrina, proceso al cual se conoce como etapa tres. (MARIA, J. 2011, p 3)

1.10.1. Tiempo de protrombina (PT).

Mediante este análisis se logra medir la etapa dos de la coagulación y así mismo evaluar de una manera indirecta la etapa tres.

Este análisis consiste en medir el tiempo de coagulación al agregar al plasma sanguíneo un exceso de tromboplastina y calcio, mediante esto se evalúan el factor I, II, V, VII y X de la coagulación, es decir todos los factores que intervienen en la etapa dos de la coagulación. (MARIA, J. 2011, p 3)

1.10.2. *Tiempo de tromboplastina parcial (PTT).*

Es un proceso en el cual se recalifica el plasma sin plaquetas, luego se agrega un sustituto plaquetario, esto nos permite evaluar el sistema intrínseco de la coagulación.

Los factores de coagulación son encontrados en el plasma, mientras que el calcio y las plaquetas son eliminados por la centrifugación y la adición del anticoagulante.

Este TTP depende de manera directa de los factores de coagulación, exceptuando el calcio, plaquetas y el factor VII, este tiempo nos permite detectar los valores de los factores de coagulación XII, IX, VIII. (DALMAU, A. 2012, p 4)

1.11. Tiempo de sangría

Es un análisis que nos permite determinar la velocidad con la que se cierran los vasos sanguíneos, para llevarlo a cabo es necesario medir la presión sanguínea y luego realizar una pequeña lesión con el fin de provocar un leve sangrado. Se seca el sangrado cada 30 segundos hasta que se detenga, luego se toma el tiempo. (DALMAU, A. 2012, p 4)

Preparación para el examen.- hay algunos medicamentos que pueden modificar este tiempo de sangrado, estos generalmente son: Dextran, AINES y salicilatos. (DALMAU, A. 2012, p 4)

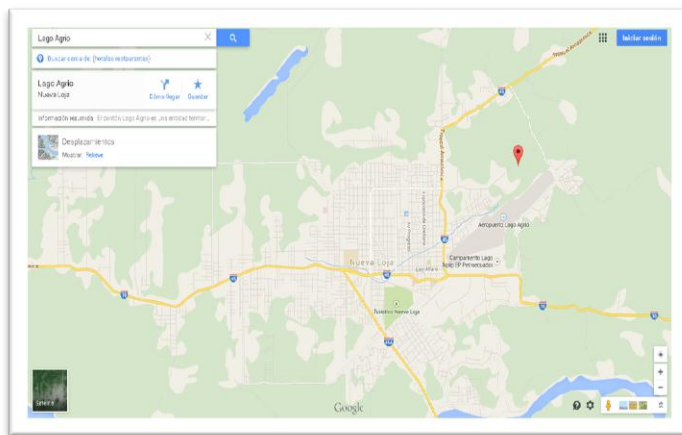
CAPITULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Lugar

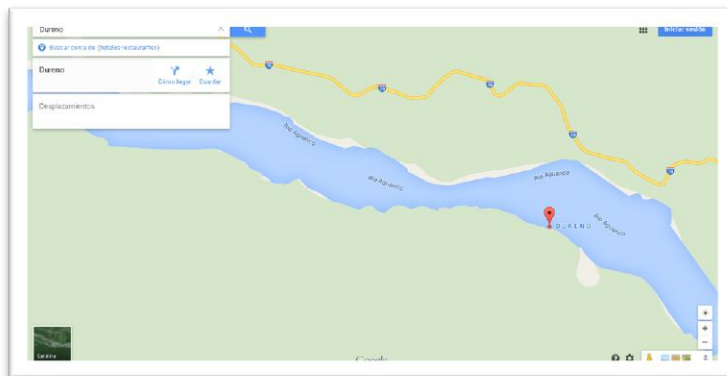
La recolección de la materia vegetal se realizó en Ecuador, provincia de Sucumbíos, cantón Lago Agrio, parroquia El Dureno, comunidad Cofan, la misma que está ubicada a 4 Kilómetros de la parroquia El Dureno, vía fluvial.

Ilustración 2- 1 Ubicación del cantón lago agrio



Tomado de: GOOGLE MAPS

Ilustración 2- 2 Ubicación de la parroquia el Dureno del cantón lago agrio



Tomado de: GOOGLE MAPS

2.2. Materiales, equipos y reactivos

2.2.1. Materiales

Cuadro 2- 1 Materiales empleados en el trabajo de titulación “estudio fitoquímico y evaluación de la actividad in vitro e in vivo de los extractos de *Brownea ariza* BENTH. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

MATERIAL	CANTIDAD
TAMIZAJE	
Reverbero	1
Tubos de Ensayo	10
Gradilla	1
Vasos de Precipitación de 500mL	2
Pipetas de 5mL	2
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (ESPECTRO UV)	
Frascos de vidrio de 500mL	5
Probeta de 100mL	2
Vasos de 50mL	5
Balones aforados de 100mL	15
Balones aforados de 1000mL	3
HIDROLISIS ACIDA	
Balones esmerilados de 500mL	2
Pipetas de 1mL	2
Reverbero	1
Mangueras	2
Refrigerante de bolas	1
Pinzas	3
Soporte Universal	1
CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)	
Capilares	5
Pipetas de 10mL	5
Aspersor	1
Mangueras	2
ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	

Balones de 100mL	3
Pipetas Pasteur	5
PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD	
Tubos de 10mL	50
Balones de 100mL	10
Gradilla	2
Soporte Universal	1
Reverberos	2
Frasco de Vidrio	1
DETERMINACIÓN DE TP Y TTP	
Puntas de 200 ug.	200
Tubos citrato	9
Balones de 100mL	10
Pipetas automáticas de 200 y 1000 ug.	1 y 1
Tubos de 10mL	150-200
Cronometro	1
DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE SANGRÍA	
Lancetas	200
Cronometro	1
Pipetas Pasteur	20
Algodón	1 funda de 200g

Realizado por: Cristhian Bravo

2.2.2. Equipos

Cuadro 2- 2 Equipos empleados en el trabajo de titulación “estudio fitoquímico y evaluación de la actividad in vitro e in vivo de los extractos de *Brownea ariza* BENTH. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.

ANÁLISIS	EQUIPOS
Tamizaje	<ul style="list-style-type: none"> • Molino • Estufa
Extracción y cuantificación (espectro UV)	<ul style="list-style-type: none"> • Agitador • Ultrasonido • Espectrofotómetro

Espectroscopia infrarroja	<ul style="list-style-type: none"> • Espectro infrarrojo
Pruebas de citotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • Bomba de Oxígeno
Determinación de TP y TTP	<ul style="list-style-type: none"> • Baño María • Centrifuga • Cronómetro

Realizado por: Crithian Bravo

2.2.3. Reactivos

Cuadro 2- 3 Reactivos empleados en el trabajo de titulación “Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad *in vitro* e *in vivo* de los extractos de *Brownea ariza* Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.

ANÁLISIS	REACTIVO
Tamizaje	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de Sudan • Reactivo de dragendorf • Reactivo de Mayer • Reactivo de Wagner • Reactivo de Baljet • Reactivo de Lieberman Buchard • Reactivo para Catequinas • Reactivo para resinas • Reactivo de Fehling • Reactivo de FeCl₃ • Reactivo de Ninhidrina • Reactivo de Borntrager • Reactivo de Shinoda • Reactivo de Antocianidinas
Extracción y cuantificación (espectro UV)	<ul style="list-style-type: none"> • Etanol 96% • Metanol 98% • Agua destilada PA • Reactivo Carbonato-Tartrato • Carbonato de Sodio 20% • Reactivo de Folin-Ciocalteu

	<ul style="list-style-type: none"> • Solución de fenol • Soluciones de Ácido Tánico • Soluciones de Ácido Gálico
Hidrolisis acida	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido sulfúrico concentrado • Ácido clorhídrico concentrado • Reactivo Metanol-Acetona (7,3)
Cromatografía en capa fina (TLC)	<ul style="list-style-type: none"> • Papel Cromatográfico
Espectroscopia infrarroja	<ul style="list-style-type: none"> • Metanol • Agua destilada PA
Pruebas de citotoxicidad	<ul style="list-style-type: none"> • Agua destilada PA • Sal Marina
Determinación de TP y TTP	<ul style="list-style-type: none"> • Reactivo de TP marca pacifichemostasis • Reactivo de TTP marca pacifichemostasis • Reactivo de NaCl 0.02M marca pacifichemostasis
Tiempo de Sangría	<ul style="list-style-type: none"> • Solución Salina 3%

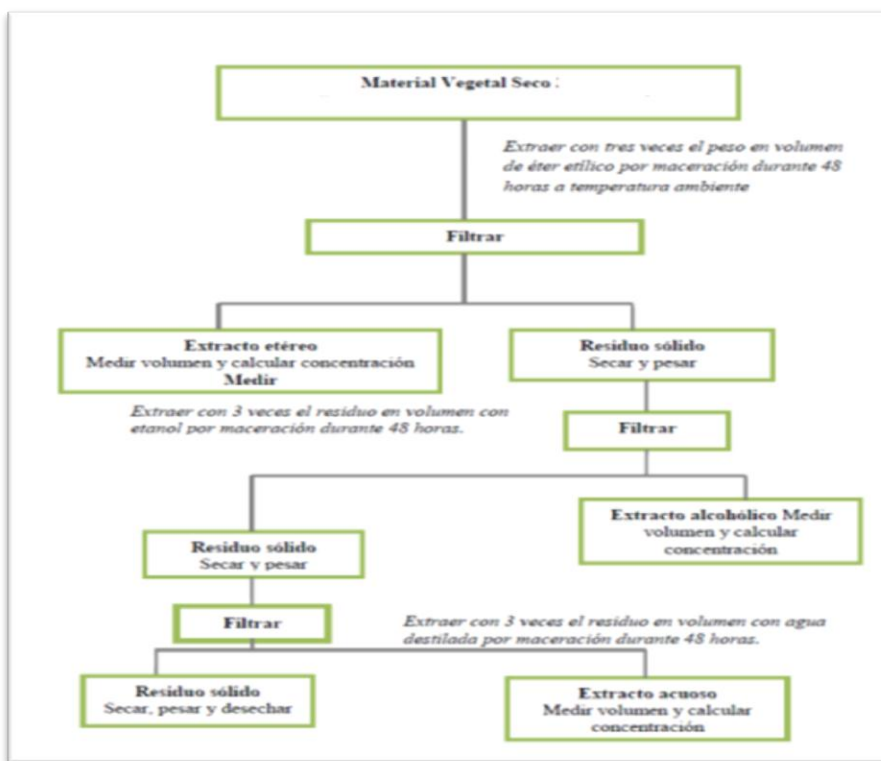
Realizado por: Cristhian Bravo

2.3. Técnicas y métodos

2.3.1. Extracción y tamizaje fitoquímico

Para la elaboración de los extractos del tamizaje se empleó una serie de solventes con polaridad creciente, por lo cual como resultado se obtuvo tres tipos de extractos: Etéreo, Etanólico y acuoso de *Brownea ariza* Benth (ver imagen N°2.3.1.)

Ilustración 2- 3 Proceso de obtención de los extractos para el tamizaje fitoquímico



Realizado por: Cristhian Bravo

Se utilizó 30g de planta en 100mL de éter, se agito durante dos horas, posteriormente se llevó a ultrasonido durante 30 minutos, se filtró y seco el residuo. A este residuo se lo peso, multiplico su peso por tres y ese fue el volumen que se agregó de Etanol, se agito durante dos horas y se llevó 30 minutos al ultrasonido, se filtró y seco el residuo. Este último residuo se pesó, multiplico su peso por tres y ese fue el volumen que se agregó de solvente, en este caso fue Agua, se procedió de la misma manera que en los extractos anteriores. (MIRANDA, M. 2006, p 1)

2.3.1.1. Ensayo de Sudan

“Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, a la alícuota de la fracción en el solvente de extracción, se le añade 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III o Sudan IV. Se calienta en baño de agua hasta evaporación del solvente

La presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente”. (MIRANDA, M. 2006, p 1)

2.3.1.2. *Ensayo de Dragendorff*

“Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, para ello, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo se disuelve en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++)” (MIRANDA, M. 2006, p 1)

2.3.1.3. *Ensayo de Mayer*

“Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++)” (MIRANDA, M. 2006, p 1)

2.3.1.4. *Ensayo de Wagner*

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma (MIRANDA, M. 2006, p 2)

2.3.1.5. *Ensayo de Baljet*

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo

“Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1 mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++) y (+++) respectivamente” (MIRANDA, M. 2006, p 2)

2.3.1.6. *Ensayo de Borntrager*

“Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo re disolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++)” (MIRANDA, M. 2006, p 2)

2.3.1.7. *Ensayo de Liebermann-Burchard*

“Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6” (MIRANDA, M. 2006, p 2)

“Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:

- Rosado-azul muy rápido.
- Verde intenso-visible aunque rápido.
- Verde oscuro-negro-final de la reacción” (MIRANDA, M. 2006, p 2)

2.3.1.8. *Ensayo de catequinas*

“Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo” (MIRANDA, M. 2006, p 3)

2.3.1.9. *Ensayo de resinas*

“Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.” (MIRANDA, M. 2006, p 3)

2.3.1.10. *Ensayo de Fehling*

“Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo”. (MIRANDA, M. 2006, p 3)

2.3.1.11. *Ensayo de la espuma*

“Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos”. (MIRANDA, M. 2006, p 3)

2.3.1.12. *Ensayo del cloruro férrico*

“Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo piro catecólicos
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo piro galotánicos”. (MIRANDA, M. 2006, p 4)

2.3.1.13. *Ensayo de la ninhidrina*

“Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo”. (MIRANDA, M. 2006, p 4)

2.3.1.14. *Ensayo de Shinoda*

“Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen”. (MIRANDA, M. 2006, p 4)

“Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado. El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos”. (MIRANDA, M. 2006, p 4)

2.3.1.15. *Ensayo de antocianidinas*

“Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico por 10 min con 1 mL de HCL conc. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo” (MIRANDA, M. 2006, p 5)

2.3.1.16. *Ensayo de mucílagos*

“Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo” (MIRANDA, M. 2006, p 6)

2.3.1.17. *Ensayo de principios amargos y astringentes*

“El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

También pueden realizarse otros ensayos no comprendidos en este esquema de tamizaje, para la detección de otros compuestos. A continuación expondremos algunos de estos ensayos (MIRANDA, M. 2006, p 3)

2.3.2. *Extractos para la cuantificación en UV e IR*

Los extractos para la cuantificación de fenol, ácido tánico y gálico se obtuvieron partiendo de una cantidad de 25g de planta (corteza) seca y triturada, se emplearon 5 disolventes:

- Metanol
- Etanol
- Metanol-Agua (5-5)
- Etanol-Agua (5-5)
- Agua

A los 25g de planta se les agregó 100mL del solvente, obteniéndose 5 extractos diferentes, a cada uno de estos se los agito durante dos horas con ayuda de un mezclador, posteriormente se los llevo a un equipo de ultrasonido durante 30 minutos. (MIRANDA, M. 2006, p 4)

2.3.2.1. *Extractos para la hidrolisis acida*

2.3.2.1.1. Extracto no hidrolizado

Para la elaboración de este extracto se partió de 25g de planta seca (corteza) y triturada, se agregó 100mL del solvente Metanol-Acetona acidulada con HCl (7-3), se agito con ayuda de un mezclador y luego se llevó a un equipo de ultrasonido durante 30 minutos (MIRANDA, M. 2006, p 4)

2.3.2.1.2. Extracto hidrolizado

Se evaporo en rota vapor el extracto no hidrolizado, una vez evaporado se agregó 100mL de Metanol acidulado 1% (H₂SO₄), se sometió a reflujo durante 2 horas.

2.3.3. Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos en agua mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu

2.3.3.1. Preparación del reactivo carbonato/tartrato

Pesar 200g de carbonato de sodio y 12g de tartrato de sodio, disolver en aproximadamente 750mL de agua desmineralizada y dejar enfriar a temperatura ambiente. Ajustar el volumen a 1000mL con agua destilada.

2.3.3.2. Preparación de la curva de calibración:

Cuadro 2- 4 Determinación colorimétrica de compuestos fenólicos en agua mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014.

	B	I	II	III	IV	V	VI	VII
Solución patrón de fenol de 50mg/L	0	0.2	0.5	1	1.5	2	5	10
Agua destilada	25	24.8	24.5	24	23.5	23	20	15
Reactivo Folin-Ciocalteu	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Reactivo Carbonato-tartrato	2	2	2	2	2	2	2	2
Correspondencia en mg/L de fenol	0	1	2.5	5	7.5	10	25	50

Realizado por: Cristhian Bravo

Agitar el contenido de los tubos, esperar treinta minutos para que se desarrolle el color y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 700nm. Trazar la curva de calibrado concentración/absorbancia. (CLESCERI, A. 2010, p 1)

2.3.3.3. Tratamiento de la muestra

Tomar 10ml de muestra, añadir 15mL de agua y proceder de la misma forma que se ha descrito en la curva de calibrado. Efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a 700nm, interpolar valores de absorbancia en la curva de calibrado para obtener los valores de concentración. (CLESCERI, A. 2010, p 1)

2.3.4. *Determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido tánico por el método de folin-ciocalteu*

2.3.4.1. *Preparación de las soluciones patrón de ácido tánico*

Se preparan una serie de patrones con concentraciones de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 ppm a partir de una solución de 50 ppm de ácido tánico y completando en todos los casos el volumen con agua destilada hasta 10 mL en matraces aforados de 50mL. (CLESCERI, A. 2010, p 2)

Cuadro 2- 5 Determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

	B	I	II	III	IV	V	
Soluciones Patrón de ácido tánico	0mL	10mL	10mL	10mL	10mL	10mL	
Agua destilada	22mL	12mL	12mL	12mL	12mL	12mL	
Reactivo Folin-Ciocalteu	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL	2mL	
Reactivo Carbonato de Sodio 20%	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	1mL	
Correspondencia en ppm	0	2	4	6	8	10	

Realizado por: Crithian Bravo

Agitar el contenido de los tubos, esperar dos minutos para que se desarrolle el color y efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 700nm. Trazar la curva de calibración concentración: absorbancia. (CLESCERI, A. 2010, p 2)

2.3.4.2. *Tratamiento de la muestra*

Tomar 10ml de muestra, añadir 12mL de agua y proceder de la misma forma que se ha descrito en la curva de calibrado. Efectuar las lecturas en el espectrofotómetro a 700nm, interpolar valores de absorbancia en la curva de calibrado para obtener los valores de concentración. (CLESCERI, A. 2010, p 2)

2.3.5. Determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu

Se prepara 10mL de soluciones de ácido gálico de 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 2 mg por mL de etanol al 96%. Se toma 6 tubos de 10ml y se coloca 0.05mL de cada una de las soluciones. (CLESCERI, A. 2010, p 3)

Cuadro 2- 6 Determinación colorimétrica de taninos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Epoch. Octubre 2014

	B	I	II	III	IV	V
Soluciones Patrón de ácido gálico	0mL	0.05mL	0.05mL	0.05mL	0.05mL	0.05mL
Agua destilada	4mL	3.95mL	3.95mL	3.95mL	3.95mL	3.95mL
Reactivo Folin-Ciocalteu	0.25mL	0.25mL	0.25mL	0.25mL	0.25mL	0.25mL
Reactivo Carbonato de Sodio 20%	0.75mL	0.75mL	0.75mL	0.75mL	0.75mL	0.75mL
Correspondencia en mg/mL	0	0.1	0.2	0.5	1	2

Realizado por: Cristhian Bravo

Dejamos reposar en la obscuridad y a temperatura ambiente durante 2 horas y luego llevamos al espectrofotómetro y medimos la absorbancia a 765nm.

2.3.5.1. Tratamiento de la muestra

Una vez generada la curva, se procedió de la misma manera con la muestra, pero esta última disuelta en etanol al 96% en una proporción 1/10. (CLESCERI, A. 2010, p 3)

2.4. Determinación del espectro infrarojo

2.4.1. Determinación de los picos del solvente (metanol)

Se mide el pH del solvente (metanol) si esta entre un rango de pH de 3 a 8, es óptimo para la medición, se limpia la lente y se coloca una gota del solvente, se lee y se obtienen los picos y los números de onda correspondientes. (CLESCERI, A. 2010, p 4)

2.4.2. *Determinación de los picos del ácido gálico en metanol*

Se disuelve 1000mg de ácido gálico en 100mL de metanol al 96%, Se mide el pH de la solución, si esta entre un rango de pH de 3 a 8, es óptimo para la medición, se limpia la lente y se coloca una gota de la solución, se lee y se obtienen los picos y los números de onda correspondientes.

2.4.3. *Determinación de los picos del extracto en metanol*

Se disuelve 1mL del extracto metanólico en 100mL de metanol al 98%, Se mide el pH de la solución, si esta entre un rango de pH de 3 a 8, es óptimo para la medición, se limpia la lente y se coloca una gota del solvente, se lee y se obtienen los picos y los números de onda correspondientes.

2.4.4. *Determinación de los picos del extracto hidrolizado disuelto en metanol*

Se disuelve 1mL del extracto Hidrolizado en 100mL de metanol al 98%, Se mide el pH de la solución, si esta entre un rango de pH de 3 a 8, es óptimo para la medición, se limpia la lente y se coloca una gota del solvente, se lee y se obtienen los picos y los números de onda correspondientes.

2.5. *Cromatografía en capa fina (TLC)*

Se prepara la fase móvil a partir de acetona, tolueno y ácido fórmico en una proporción 3/3/1, también las soluciones reveladoras vainillina/H₂SO₄ y FeCl₃/HCl

En dos pedazos de crómato-rollo de sílica gel 60PF 254 (Merck) se inyecta a una distancia de 10mm el extracto no hidrolizado, el extracto hidrolizado, un estándar de ácido tánico y gálico para cada una de las placas. (AMÉRICO, A. 1980, p 5)

Se colocan las placas en una cuba de manera vertical y se espera a que la fase móvil recorra las superficies hasta que falte 1cm para que llegue al extremo superior de las placas. (AMÉRICO, A. 1980, p 6)

Sacamos las placas de la cuba y revelamos cada una con ayuda del aspersor, la primera con vainillina/H₂SO₄ y calentamos a 120°C, medimos las manchas y calculamos el R_f para cada una de las manchas. (AMÉRICO, A. 1980, p 7)

Tomamos la segunda placa y la revelamos con FeCl₃/HCl, calculamos los R_f de cada una de las manchas. (AMÉRICO, A. 1980, p 7)

2.6. Citotoxicidad

1. Se prepara 2000mL de agua salada a partir de sal marina (1% NaCl).
2. Se toma 1000 mL, se coloca en un recipiente transparente, con una fuente de luz blanca y a una temperatura de 25°C y con una fuente de oxígeno.
3. Agregamos al recipiente 0.950 mg de huevos de *artemia salina*
4. Esperamos 48 horas y recolectamos los nauplios.
5. Se prepara en tubos las diferentes soluciones a partir de 31.25 ppm de extracto hasta los 1000 ppm, empleando el restante de agua salada como solvente.
6. Colocamos en cada tubo 10 nauplios (*artemia salina*)
7. Esperamos 24 horas y contamos las *artemia salina* sobrevivientes.
8. Tabulamos los resultados en la herramienta de análisis Probit del paquete de software estadístico NCSS y determinamos la concentración letal media de nuestro extracto.

2.7. Tiempo de protrombina (TP) y tromboplastina (TTP)

2.7.1. Tiempo de protrombina (TP)

1. Realizamos una punción sanguínea con vacutainer empleando el tubo citrato para obtener la muestra de sangre.
2. Introducimos la muestra en una centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos para obtener el plasma sanguíneo.
3. Separamos 100ug de plasma con ayuda de una pipeta y depositamos en un tubo de ensayo.
4. Seguidamente agregamos 200ug de reactivo de TP y tomamos el tiempo con un valor de referencia de 13 segundos.

2.7.2. Tiempo de tromboplastina (TTP)

1. Realizamos una punción sanguínea con vacutainer empleando el tubo citrato para obtener la muestra de sangre.

2. Introducimos la muestra en una centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos para obtener el plasma sanguíneo.
3. Separamos 100ug de plasma con ayuda de una pipeta y depositamos en un tubo de ensayo.
4. Colocamos en el mismo tubo de ensayo 100ug de reactivo de TTP y lo colocamos a incubar en un baño maría durante 3 minutos a una temperatura de 35°C
5. Sacarlo y agregar inmediatamente 100ug de cloruro de calcio y medir el tiempo que demora en formarse el coagulo de fibrina con un valor de referencia de 37 segundos.

2.7.3. *Tiempo de protrombina (TP) empleando el extracto hidrolizado y el no hidrolizado*

1. Realizamos una punción sanguínea con vacutainer empleando el tubo citrato para obtener la muestra de sangre.
2. Introducimos la muestra en una centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos para obtener el plasma sanguíneo.
3. Separamos 100ug de plasma con ayuda de una pipeta y depositamos en un tubo de ensayo.
4. Seguidamente agregamos 200ug de cada una de las diluciones de los extractos (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 ppm) y tomamos el tiempo con un valor de referencia de 13 segundos.

2.7.4. *Tiempo de tromboplastina (TTP) empleando el extracto hidrolizado y el no hidrolizado*

1. Realizamos una punción sanguínea con vacutainer empleando el tubo citrato para obtener la muestra de sangre.
2. Introducimos la muestra en una centrifuga a 3500 rpm durante 5 minutos para obtener el plasma sanguíneo.
3. Separamos 100ug de plasma con ayuda de una pipeta y depositamos en un tubo de ensayo.
4. Colocamos en el mismo tubo de ensayo 100ug de reactivo de TTP y lo colocamos a incubar en un baño maría durante 3 minutos a una temperatura de 35°C
5. Sacarlo y agregar inmediatamente 100ug cada una de las diluciones de los extractos (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781 ppm)y medir el tiempo que demora en formarse el coagulo de fibrina con un valor de referencia de 37 segundos.

2.8. *Tiempo de sangría*

1. Preparamos una lanceta, algodón con alcohol y papel absorbente

2. Desinfectamos el dedo en el que vamos a realizar la punción.
3. Tomamos una lanceta estéril, abrimos su empaque y realizamos una puncion.
4. Cada 30 segundos limpiamos la sangre hasta que pare el sangrado
5. Anotamos el tiempo de sangría. (Método de DUKE)

CAPITULO III

3. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

3.1. Tamizaje fitoquímico

Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos de *Brownea ariza* Benth, partiendo de 50g de la corteza seca y molida, obteniendo tres extractos:

- **Extracto etéreo.-** con un volumen de 62mL, a una concentración de 33mg (sólidos totales)/mL y con un residuo seco de 48g.
- **Extracto alcohólico (Etanol 96%).-**con un volumen de 120mL, a una concentración de 56mg (sólidos totales)/mL y con un residuo seco de 41.35g.
- **Extracto Acuoso.-** con un volumen de 90mL, a una concentración de 29mg (sólidos totales)/mL y con un residuo seco de 38.75g.

Cuadro 3- 1 Características de los extractos de *Brownea ariza* Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

EXTRACTOS	
EXTRACTO ETEREO	
Residuo seco:	48g.
Volumen:	62mL.
Concentración:	33mg/mL
EXTRACTO ALCOHÓLICO (ETANOL AL 96%)	
Residuo seco:	41.35g.
Volumen:	120mL.
Concentración:	56mg/mL
EXTRACTO ACUOSO	
Residuo seco:	38.75g.
Volumen:	90mL.
Concentración:	29mg/mL

Realizado por: Cristhian Bravo

Al realizar las pruebas cualitativas a cada uno de los extractos de acuerdo a MIRANDA, M. (2006), se determinaron los siguientes tipos de compuestos:

Extracto etéreo: Se obtuvo un resultado positivo para esteroides (Lieberman Buchard), grasas y aceites (Ensayo de sudan)

Cuadro 3- 2 Tamizaje fitoquímico del extracto etéreo de *Brownea ariza* Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

1.Ensayo de Sudan:	Positivo para grasas y aceites
2.Ensayo de Dragendorf:	Negativo
3.Ensayo de Mayer:	Negativo
4.Ensayo de Wagner:	Negativo
5.Ensayo de Baljet:	Negativo
6.Ensayo de Lieberman Buchard:	Positivo para esteroides

Realizado por: Cristhian Bravo

Extracto Alcohólico: Se obtuvo un resultado positivo para lactonas, esteroides, saponinas, taninos de tipo pirocatecolico, quinonas, flavonoides y antocianidinas. Siendo los de mayor importancia para el presente trabajo los taninos, puesto que a los mismos se les atribuye la capacidad de precipitar proteínas y el efecto antihemorrágico. (HARINDER, P. 2003, p 7)

Cuadro 3- 3 Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de *Brownea ariza* Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

EXTRACTO ALCOHÓLICO (ETANOL AL 96%)	
1.Ensayo de Catequinas:	Negativo
2.Ensayo de Espuma:	Negativo
3.Ensayo de Fehling:	Negativo
4.Ensayo de Baljet:	Positivo para lactonas
5.Ensayo de Lieberman-Buchard:	Positivo para esteroides
6.Ensayo de Espuma:	Positivo para saponinas
7.Ensayo de Cl₃Fe:	Positivos (taninos de tipo pirocatecólicos)
8.Ensayo de Bortrager:	Positivo para quinonas
9.Ensayo de Shinoda:	Positivo par flavonoides
10.Ensayo de Antocianidinas:	Positivos para antocianidinas
11.Ensayo de Dragendorf:	Negativo

12.Ensayo de Mayer:	Negativo
13.Ensayo de Wagner:	Negativo

Realizado por: Cristhian Bravo

Extracto acuoso: Se obtuvo un resultado positivo para taninos, flavonoides, saponinas y principios amargos, el encontrar taninos presentes en este extracto es a causa de la polaridad de los mismos.

Cuadro 3- 4 Tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de *Brownea ariza* Benth. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

EXTRACTO ACUOSO	
1.Ensayo de Dragendorf:	Negativo
2.Ensayo de Mayer:	Negativo
3.Ensayo de Wagner:	Negativo
4.Ensayo de Cl₃Fe	Positivo para taninos
5.Ensayo de Shinoda	Positivo para flavonoides
6.Ensayo de Fehling	Negativo
7.Ensayo de Espuma	Positivo para saponinas
8.Ensayo de Mucilagos	Negativo
9..Ensayo de Principios amargos	Astringente

Realizado por: Cristhian Bravo

3.2. Cuantificación de fenoles, ácido tánico y gálico.

3.2.1. *Cuantificación de compuestos fenólicos expresada como fenol*

La cuantificación de fenoles se llevó a cabo por el método de Folin-Ciocalteu, primeramente se elaboró la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta con un coeficiente $R^2 = 0.9952$ (CLESCERI, A. 2010, p 9)

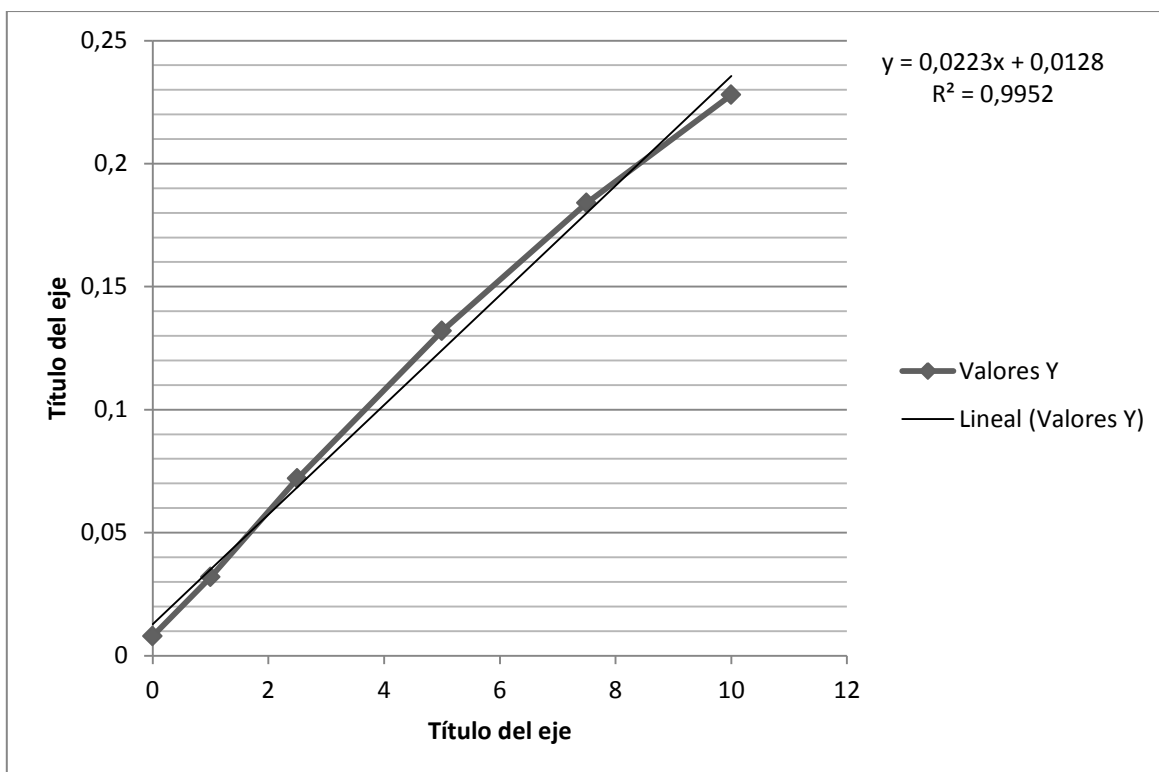
Cuadro 3- 5 Curva de calibración de fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

CURVA DE CALIBRACIÓN	
Concentración en	Absorbancia

ppm de fenol (X)	(Y)
0	0,008
1	0,032
2,5	0,072
5	0,132
7,5	0,184
10	0,228

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 1 Curva de calibración de fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Al proceder a tomar la lectura de las absorbancias de los diferentes extractos encontramos que los que presentan mayor coloración y por ende mayor absorbancia son los extractos metanol/agua con una $A=0.159$ y etanol/agua con una $A=0.186$

Cuadro 3- 6 Absorbancias de los extractos expresados como fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Solvente	Absorbancia (I)	Absorbancia (II)	Absorbancia (III)	Promedio
Metanol	0,130	0,151	0,137	0.139
Etanol	0,109	0,125	0,115	0.116
Metanol/Agua	0,134	0,185	0,159	0.159
Etanol/Agua	0,163	0,03	0,192	0.186
Agua	0,042	0,053	0,058	0.051

Realizado por: Cristhian Bravo

Con los datos de absorbancia de las muestras y la ecuación de la recta obtenida a partir de la elaboración de la curva de calibración del fenol, se logró establecer la concentración promedio de cada uno de los extractos, sabiendo así que el extracto que presenta una mejor extracción es aquel en el que se empleó Etanol/agua (5:5) como solvente, obteniendo una concentración de 7.7668 ppm.

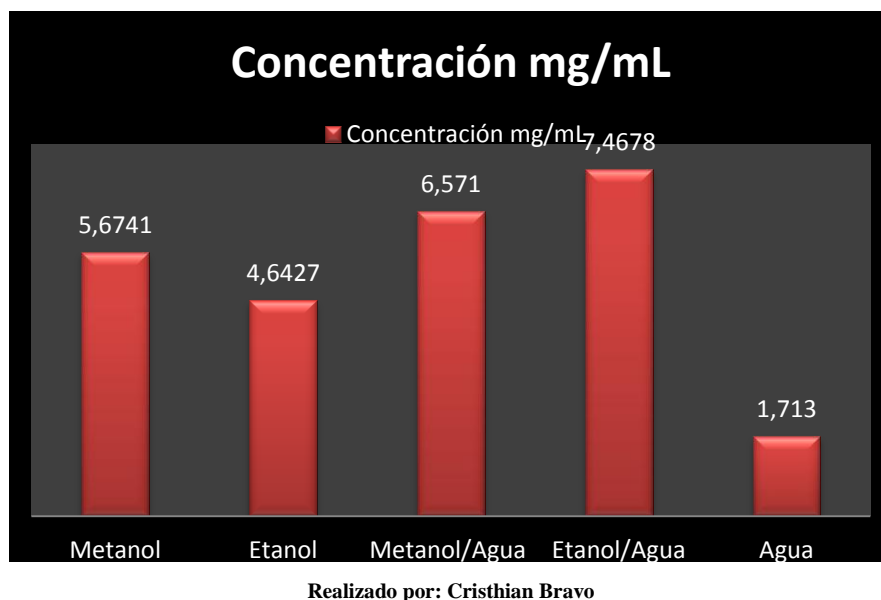
Estos datos son extrapolables a miligramos por mililitro, puesto que de cada extracto se tomó 1mL y se diluyó a 1000mL de agua destilada, es por ello que la concentración real de compuestos fenólicos es 7.7668mg/mL

Cuadro 3- 7 Concentración de los extractos expresados como fenol por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Solvente	Concentración mg/mL
Metanol	5,6741 ($\pm 0,4794$)
Etanol	4,6427 ($\pm 0,3624$)
Metanol/Agua	6,5710 ($\pm 1,1435$)
Etanol/Agua	7,4678 ($\pm 0,6656$)
Agua	1,7130 ($\pm 0,3670$)

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 2 Barras de la concentración de fenol por el método de Folin-Ciocalteu.



3.2.2. Cuantificación de taninos expresada como ácido tánico

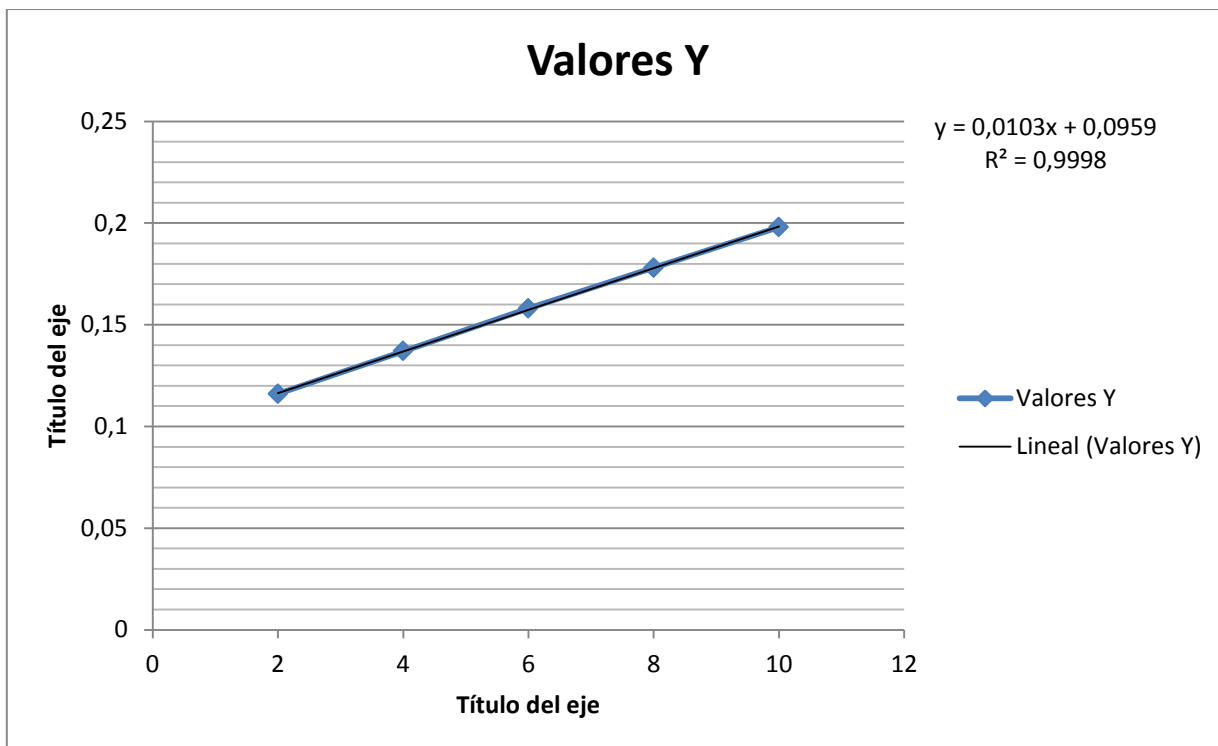
La cuantificación del ácido tánico se llevó a cabo por el método de Folin-Ciocalteu, primeramente se elaboró la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta con un coeficiente $R^2 = 0.9998$ (CLESCERI, A. 2010, p 10)

Cuadro 3- 8 Curva de calibración de ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

CURVA DE CALIBRACIÓN	
Concentración en ppm de Ácido Tánico (X)	Absorbancia (Y)
0	0,024
2	0,116
4	0,137
6	0,158
8	0,178
10	0,198

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 3 Curva de calibración de ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Al proceder a tomar la lectura de las absorbancias de los diferentes extractos encontramos que los que presentan mayor coloración y por ende mayor absorbancia son el extracto de metanol con una $A=0.1843$ y el de metanol/agua con una $A=0.1696$

Cuadro 3- 9 Absorbancias de los extractos expresados como ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Solvente	Absorbancia (I)	Absorbancia (II)	Absorbancia (III)	Promedio
Metanol	0,184	0,185	0,184	0.1843
Etanol	0,139	0,138	0,137	0.1380
Metanol/Agua	0,171	0,170	0,168	0.1696
Etanol/Agua	0,133	0,136	0,134	0.1343
Agua	0,130	0,128	0,125	0.1276

Realizado por: Cristhian Bravo

Con los datos de absorbancia de las muestras y la ecuación de la recta obtenida a partir de la elaboración de la curva de calibración del ácido tánico, se logró establecer la concentración promedio de cada uno de los extractos, sabiendo así que el extracto que presenta una mejor extracción es aquel en el que se empleó Metanol 98% como solvente, el cual tiene una concentración de 8.5825 ppm.

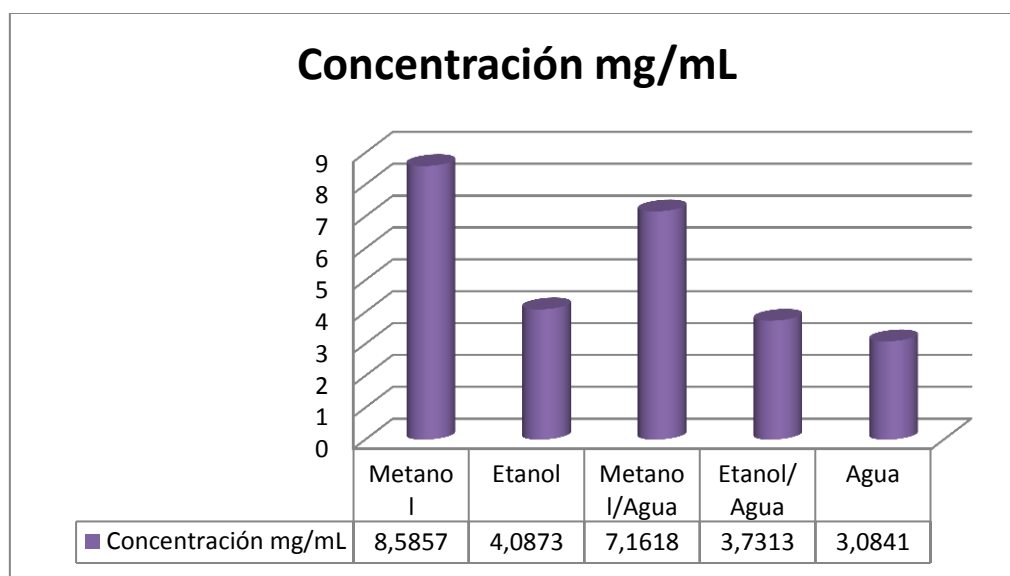
Estos datos son extrapolables a miligramos por mililitro, puesto que de cada extracto se tomó 1mL y se diluyó a 1000mL de agua destilada, es por ello que la concentración real de taninos es 8.5825mg/mL

Cuadro 3- 10 Concentración de los extractos expresados como ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Solvente	Concentración mg/mL
Metanol	8,5857 ($\pm 0,0560$)
Etanol	4,0873 ($\pm 0,0970$)
Metanol/Agua	7,1618 ($\pm 0,1483$)
Etanol/Agua	3,7313 ($\pm 0,1483$)
Agua	3,0841 ($\pm 0,2443$)

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 4 Barras de la concentración de ácido tánico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.2.3. Cuantificación de taninos expresada como ácido gálico

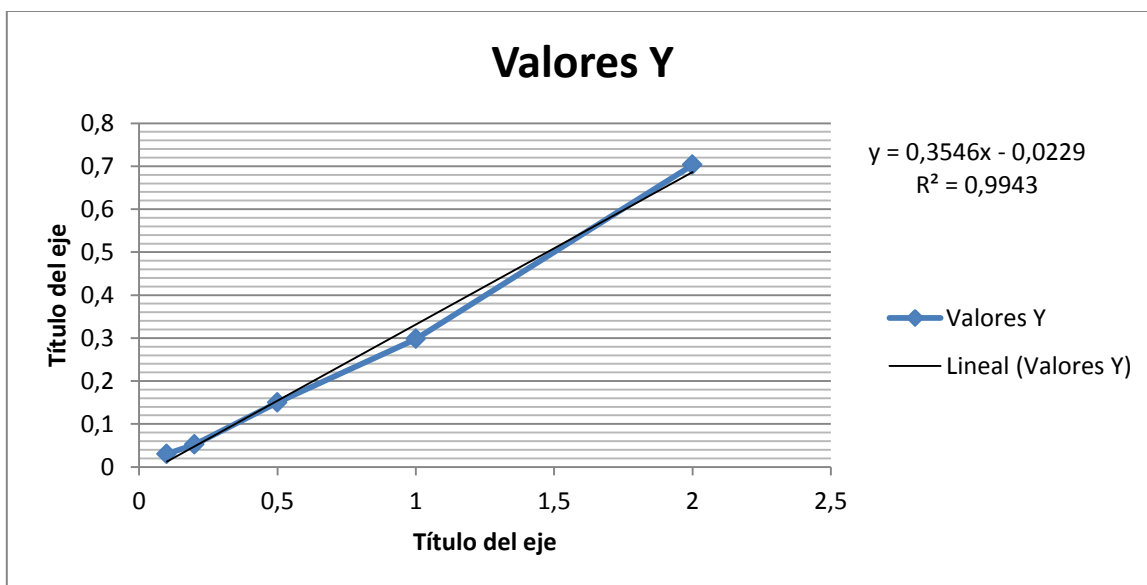
La cuantificación del ácido gálico se llevó a cabo por el método de Folin-Ciocalteu, primeramente se elaboró la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta con un coeficiente $R^2 = 0.9943$ (CLESCERI, A. 2010, p 9)

Cuadro 3- 11 Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

CURVA DE CALIBRACIÓN	
Concentración en mg/mL de Acido Gálico (X)	Absorbancia (Y)
0,1	0,030
0,2	0,052
0,5	0,150
1	0,298
2	0,703

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 5 Curva de calibración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Al proceder a tomar la lectura de las absorbancias de los diferentes extractos encontramos que los que presentan mayor coloración y por ende mayor absorbancia son el extracto de metanol con una $A=0.1653$ y el de etanol/agua con una $A=0.1397$

Cuadro 3- 12 Absorbancias de los extractos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Solvente	Absorbancia (I)	Absorbancia (II)	Absorbancia (III)	Promedio
Metanol	0,169	0,167	0,16	0.1653
Etanol	0,105	0,102	0,103	0.1033
Metanol/Agua	0,136	0,134	0,133	0.1343
Etanol/Agua	0,140	0,138	0,141	0.1397
Agua	0,056	0,054	0,058	0.056

Realizado por: Cristhian Bravo

Con los datos de absorbancia de las muestras y la ecuación de la recta obtenida a partir de la elaboración de la curva de calibración del ácido tánico, se logró establecer la concentración promedio de cada uno de los extractos, sabiendo así que el extracto que presenta una mejor extracción es aquel en el que se empleó Metanol 98% como solvente, el cual tiene una concentración de 0.5307 ppm.

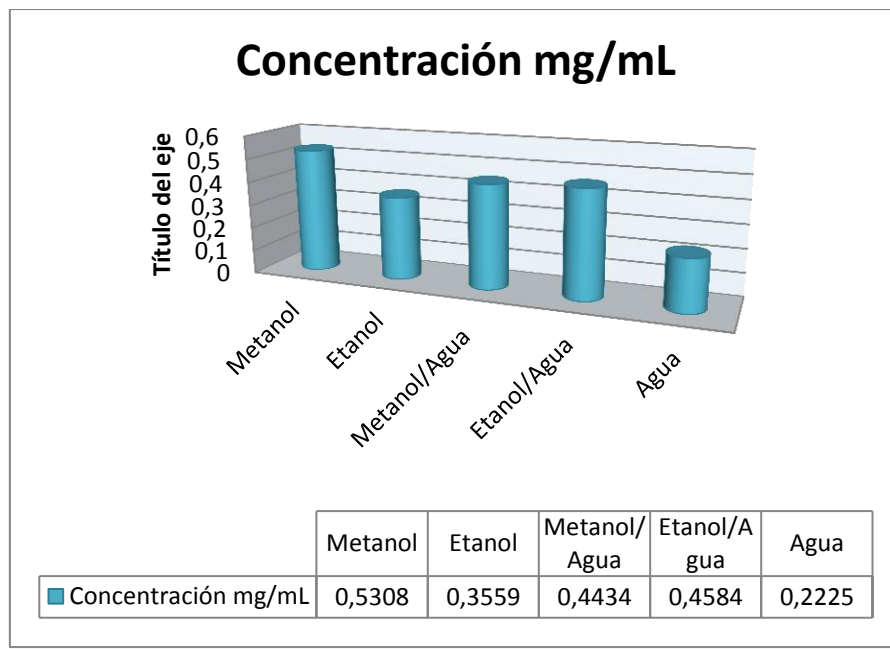
Estos datos son extrapolables a miligramos por mililitro, puesto que de cada extracto se tomó 1mL y se diluyó a 1000mL de agua destilada, es por ello que la concentración real de taninos es 0.5307mg/mL

Cuadro 3- 13 Concentración de los extractos expresados como ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Solvente	Concentración mg/mL
Metanol	0,5308 ($\pm 0,0133$)
Etanol	0,3559 ($\pm 0,0043$)
Metanol/Agua	0,4434 ($\pm 0,0043$)
Etanol/Agua	0,4584 ($\pm 0,0043$)
Agua	0,2225 ($\pm 0,0056$)

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 6 Barras de la concentración de ácido gálico por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.2.4. Evaluación de los solventes (exhaustividad de extracción)

Con los resultados obtenidos de la cuantificación de los extractos expresados como: fenol, ácido tánico y ácido gálico, podemos determinar cuál es el mejor solvente para extraer de *Brownea ariza* Benth este tipo de sustancias.

Cuadro 3- 14 Exhaustividad de extracción por el método de Folin-Ciocalteu. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

TIPO DE ESTRUCTURA	SOLVENTE
Fenoles	Etanol/Agua (5-5)
Ácido Tánico	Metanol (98%)
Ácido Gálico	Metanol (98%)

Realizado por: Cristhian Bravo

Por lo tanto, en el caso de los extractos de *Brownea ariza* Benth, si se desea extraer:

- Fenoles a partir de 25g de planta, el mejor solvente será el Etanol/Agua (5:5) extrayendo 7.4678 ($\pm 0,6656$) miligramos de fenol por cada mililitro de extracto (100mL), es decir unos 746,78 ($\pm 66,56$) mg/25g de planta

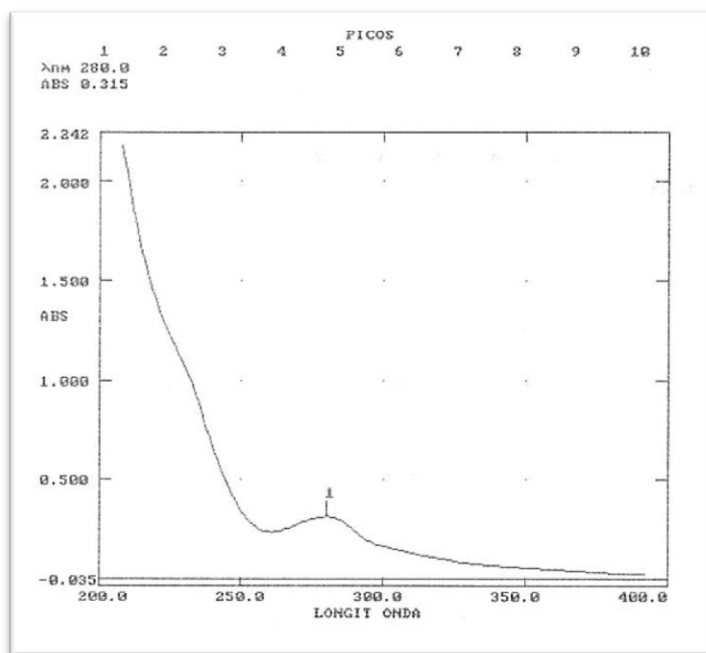
- Ácido tánico a partir de 25g de planta, el mejor solvente será el Metanol al 98% extrayendo 8,5857 ($\pm 0,0560$) miligramos de Ácido tánico por cada mililitro de extracto (100mL), es decir unos 858,57 ($\pm 5,6$) mg/25g de planta
- Ácido Gálico a partir de 25g de planta, el mejor solvente será el Metanol al 98% extrayendo 0.5308 ($\pm 0,0133$) miligramos de Ácido Gálico por cada mililitro de extracto (100mL), es decir unos 53,08 ($\pm 1,33$) mg/25g de planta

3.3. Barrido inteligente de los extractos

Se realizó un barrido inteligente de los extractos, estos fueron la primera serie de los 15 extractos. Se realizó una dilución de 1/1000 en agua destilada, luego se corrió el barrido inteligente a un rango de longitud de onda de 200 a 400 nm. Posteriormente se manipuló la gráfica extendiendo su límite en la escala de 2.000 a 6.000 con el fin de que se vea el pico de una mejor manera.

3.3.1. Extracto metanólico:

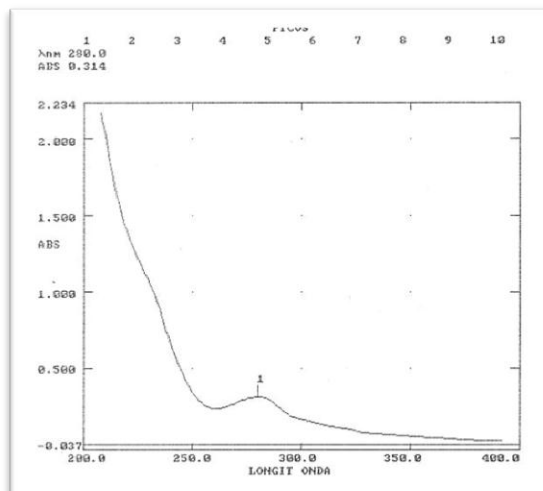
Gráfica 3- 7 Barrido inteligente del extracto metanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.3.2. Extracto etanólico

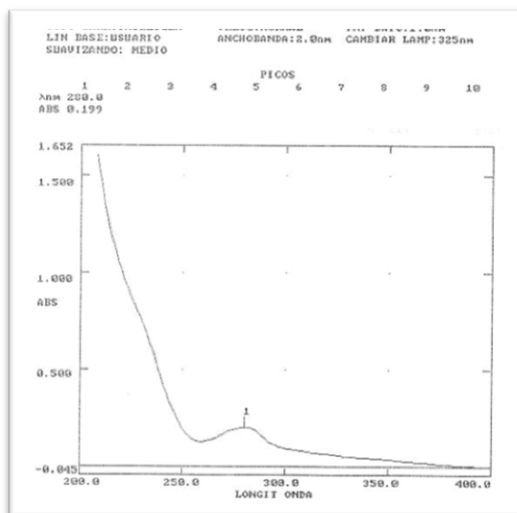
Gráfica 3- 8 Barrido inteligente del extracto etanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.3.3. Extracto metanol/agua (1-1)

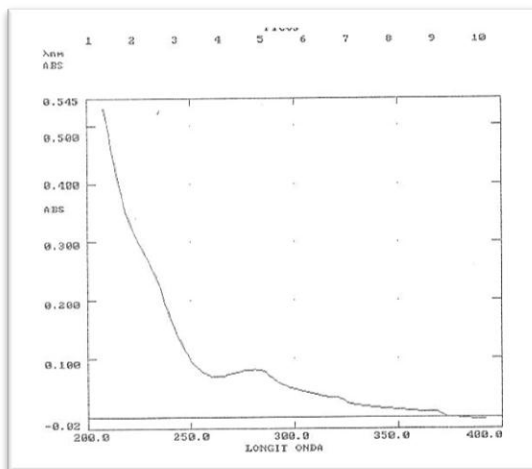
Gráfica 3- 9 Barrido inteligente del extracto metanol/agua (1-1). Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.3.4. *Extracto acuoso:*

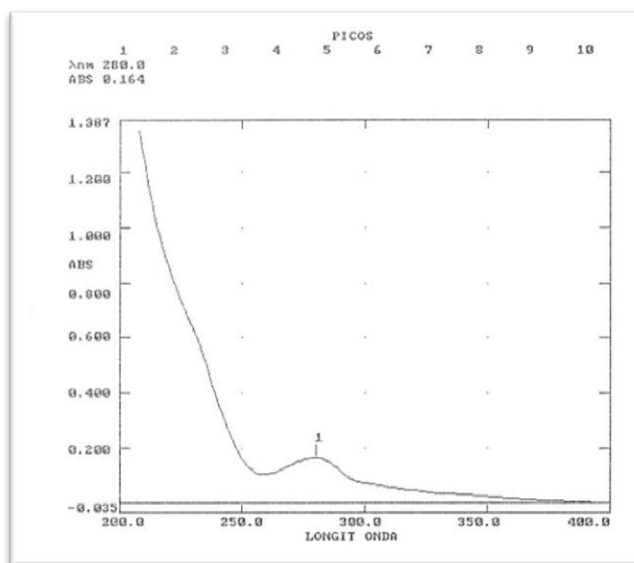
Gráfica 3- 10 Barrido inteligente del extracto acuoso. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.3.5. *Extracto etanol: agua (1-1)*

Gráfica 3- 11 Barrido inteligente del etanol/agua (1-1). Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Al observar cada una de las gráficas se pudo ver que en todos los extractos existe un solo pico y que este absorbe a una longitud de onda de 280 nm.

3.4. Pruebas del tamizaje para el extracto no hidrolizado

Se realizó el tamizaje fitoquímico al extracto en el cual el solvente es Metanol/acetona acidulada (7/3) con el fin de determinar los compuestos que se hallaban en el mismo, antes de hidrolizar.

Cuadro 3- 15 Tamizaje fitoquímico al extracto no hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Ensayo de Espuma:	Positivo para saponinas
Ensayo de Shinoda:	Positivo par flavonoides
Ensayo de Cl_3Fe:	Positivos (taninos de tipo pirocatecolicos)

Realizado por: Cristhian Bravo

3.5. Pruebas del tamizaje para el extracto hidrolizado

Al realizar el tamizaje fitoquímico al extracto hidrolizado notamos que los flavonoides y saponinas se degradaron y quedaron solo los taninos, a los cuales se les atribuye la actividad antihemorrágica o capacidad de coagular proteínas.

Cuadro 3- 16 Tamizaje fitoquímico al extracto hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Ensayo de Espuma:	Negativo para saponinas
Ensayo de Shinoda:	Negativo par flavonoides
Ensayo de Cl_3Fe:	Positivos (taninos de tipo pirocatecolicos)

Realizado por: Cristhian Bravo

Los datos obtenidos de estos dos análisis cualitativos son de vital importancia puesto que hay que dilucidar que la actividad antihemorrágica se deba solo a los taninos o también intervengan los flavonoides, cabe mencionar que al realizar la hidrolisis acida, los flavonoides se descomponen por las mismas condiciones de la reacción y los taninos por otro lado se hidrolizan y dan como resultado ácidos, tales como el tánico y gálico, motivo por el cual el pH desciende totalmente y para pruebas posteriores se requerirá neutralizar, es decir llegar a un pH de 7.

3.6. Cromatografía en capa fina

Se determinó mediante cromatografía en capa fina la presencia de taninos, al no encontrar en bibliografía valores de R_f de taninos o compuestos fenólicos, se procedió a aplicar también estándares conjuntamente con los extractos hidrolizado y no hidrolizado.

Ilustración 3- 1 TLC de los extractos: no hidrolizado e hidrolizado y los estándares de ácido tánico, gálico revelados con vainillina/ H_2SO_4 . Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Ilustración 3- 2 TLC de los extractos: no hidrolizado e hidrolizado y los estándares de ácido tánico, gálico revelados con $FeCl_3/HCl$. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Al calcular los Rf para cada uno de los extractos y estándares se puede decir que todos los compuestos son muy semejantes, por tanto los taninos que se encuentran en los extractos no son ácido tánico y gálico específicamente, sino más bien compuestos con una estructura muy semejante, puesto que el ácido tánico y gálico presentan los mismos Rf y tienen estructuras muy similares.

Cuadro 3- 17 Rf de los estándares de ácido tánico, gálico y los extractos: no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

RESULTADOS			
Mancha	Inyectado	Rf Vainillina/H₂SO₄	Rf FeCl₃/HCl
M1	Extracto Hidrolizado	0.50	0.51
M2	Extracto no Hidrolizado	0.53	0.52
M3	Ácido Tánico	0.54	0.54
M4	Ácido Gálico	0.54	0.54

Realizado por: Cristhian Bravo

3.7. Espectro infrarrojo

3.7.1. Numero de onda y transmitancia del metanol

Se determinó mediante el espectro infrarrojo el número de onda y el porcentaje de transmitancia de los componentes del metanol, esto con el fin de correr en el mismo equipo a un estándar de ácido gálico, así como también a los extractos metanólico e hidrolizado y así poder discernir cuales son los picos (número de onda) que corresponden a los componentes (taninos) y al solvente.

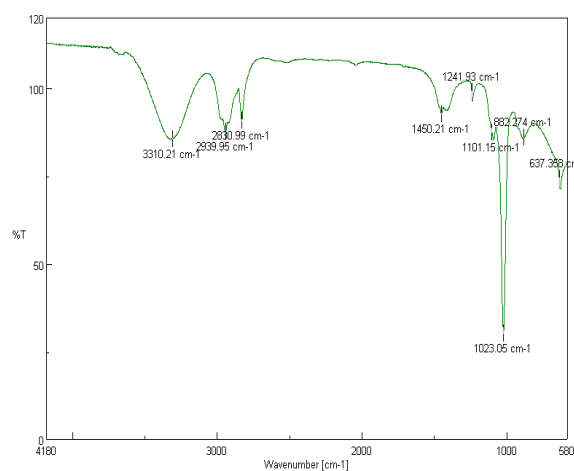
Cuadro 3- 18 Número de onda y transmitancia del metanol. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

METANOL	
NUMERO DE ONDA (cm⁻¹)	% TRANSMITANCIA
3310,21	85,5932
2939,95	87,7817
2830,99	90,7215
1450,21	92,8068
1241,93	98,9571

1101,15	87,4062
1023,05	30,2292
882,247	85,9339
637,358	74,3531

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 12 Espectro infrarrojo del metanol. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.7.2. *Numero de onda y transmitancia del ácido gálico*

Se determinó mediante el espectro infrarrojo el número de onda y el porcentaje de transmitancia de los componentes del ácido gálico, esto con el fin de correr en el mismo equipo a los extractos metanólico e hidrolizado y así poder comparar los picos y determinar similitud entre las estructuras (número de onda), es decir establecer si los extractos presentan componentes semejantes a los del ácido gálico, esto en base a los Rf obtenidos en la cromatografía en capa fina, en la cual se asevera similitud de estructuras.

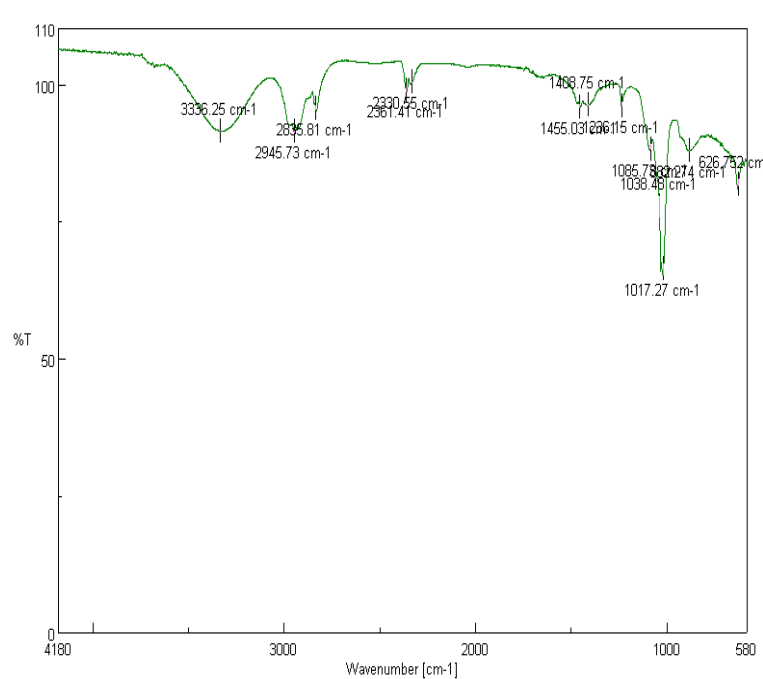
Cuadro 3- 19 Número de onda y transmitancia del ácido gálico en metanol. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

ÁCIDO GÁLICO EN METANOL	
NUMERO DE ONDA (CM ⁻¹)	% TRANSMITANCIA

3336,25	91,3541
2945,73	91,2401
2835,81	95,5304
2361,41	98,7016
1330,55	100,258
1455,03	95,6728
1408,75	96,066
1236,15	95,9233
1085,73	88,1445
1038,48	77,7538
1017,27	66,3245
882,247	87,7381
626,752	81,7551

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 13 Espectro infrarrojo del ácido gálico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Epoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.7.3. *Numero de onda y transmitancia del extracto metanólico*

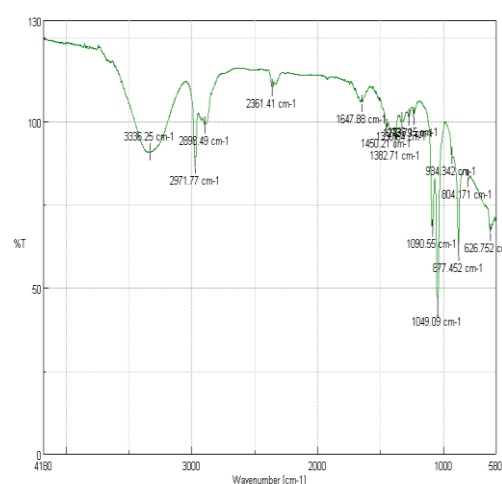
Se determinó mediante el espectro infrarrojo el número de onda y el porcentaje de transmitancia de los componentes del extracto metanolico, esto con el fin de correr en el mismo equipo al ácido gálico y el extracto hidrolizado y así poder comparar los picos y determinar similitud entre las estructuras (número de onda), es decir establecer si los extractos presentan componentes semejantes a los del ácido gálico.

Cuadro 3- 20 Número de onda y transmitancia del extracto metanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Epoch. Octubre 2014

EXTRACTO METANOLICO	
NUMERO DE ONDA (CM ⁻¹)	% TRANSMITANCIA
3336,25	90,5293
2971,77	86,6783
2898,49	98,6267
2361,41	109,693
1647,88	105,211
1450,21	97,831
1382,71	94,2807
1330,64	99,776
1272,79	100,979
1236,15	101,189
1090,55	67,6815
1049,09	44,3684
934,342	89,4709
877,452	60,5113
804,171	82,4168
626,752	66,4906

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 14 Espectro infrarrojo del extracto metanólico. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.7.4. Numero de onda y transmitancia del extracto hidrolizado

Se determinó mediante el espectro infrarrojo el número de onda y el porcentaje de transmitancia de los componentes del extracto hidrolizado, esto con el fin de correr en el mismo equipo al ácido gálico y el extracto metanólico y así poder comparar los picos y determinar similitud entre las estructuras (número de onda), es decir establecer si los extractos presentan componentes semejantes a los del ácido gálico.

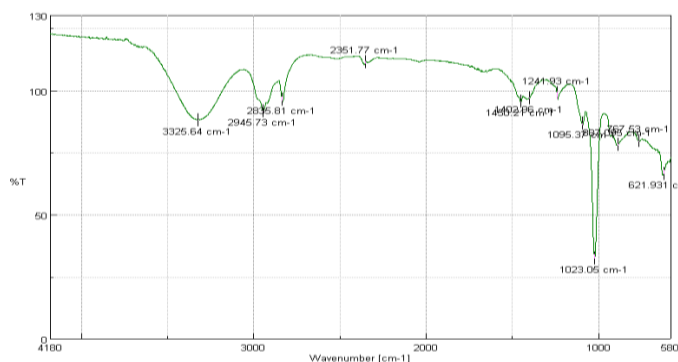
Cuadro 3- 21 Número de onda y transmitancia del extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

EXTRACTO HIDROLIZADO	
NUMERO DE ONDA (CM ⁻¹)	% TRANSMITANCIA
3325,64	88,056
2945,73	91,5485
2835,81	96,2601
2351,77	111,263
1450,21	95,367
1402,96	96,7704
1241,93	98,9152
1095,37	86,6496

1023,05	32,5242
887,095	78,125
767,53	79,6119
621,931	66,3821

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 15 Espectro infrarrojo del extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.7.5. Comparación de los números de onda encontrados en el metanol, ácido gálico en metanol, extractos metanólico e hidrolizado

Se comparó las longitudes de onda entre el solvente (metanol), el estándar (ácido gálico) y los extractos, con el fin de determinar similitud entre los picos (cm^{-1})

Cuadro 3- 22 Comparación entre los números de onda encontrados en el metanol, ácido gálico en metanol, extracto metanólico e hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

METANOL (cm^{-1})	ÁCIDO GÁLICO (cm^{-1})	EXTRACTO METANOLICO (cm^{-1})	EXTRACTO HIDROLIZADO (cm^{-1})
3310,21	3336,25	3336,25	3325,64
2939,95	2945,73	2971,77	2945,73
2830,99	2835,81	2898,49	2835,81
1450,21	2361,41	2361,41	2351,77
1241,93	1330,55	1647,88	1450,21

1101,15	1455,03	1450,21	1402,96
1023,05	1408,75	1382,71	1241,93
882,247	1236,15	1330,64	1095,37
637,358	1085,73	1272,79	1023,05
	1038,48	1236,15	887,095
	1017,27	1090,55	767,53
	882,247	1049,09	621,931
	626,752	934,342	
		877,452	
		804,171	
		626,752	

Realizado por: Cristhian Bravo

3.7.6. Comparación de los números de onda encontrados en el ácido gálico en metanol, extractos metanólico e hidrolizado.

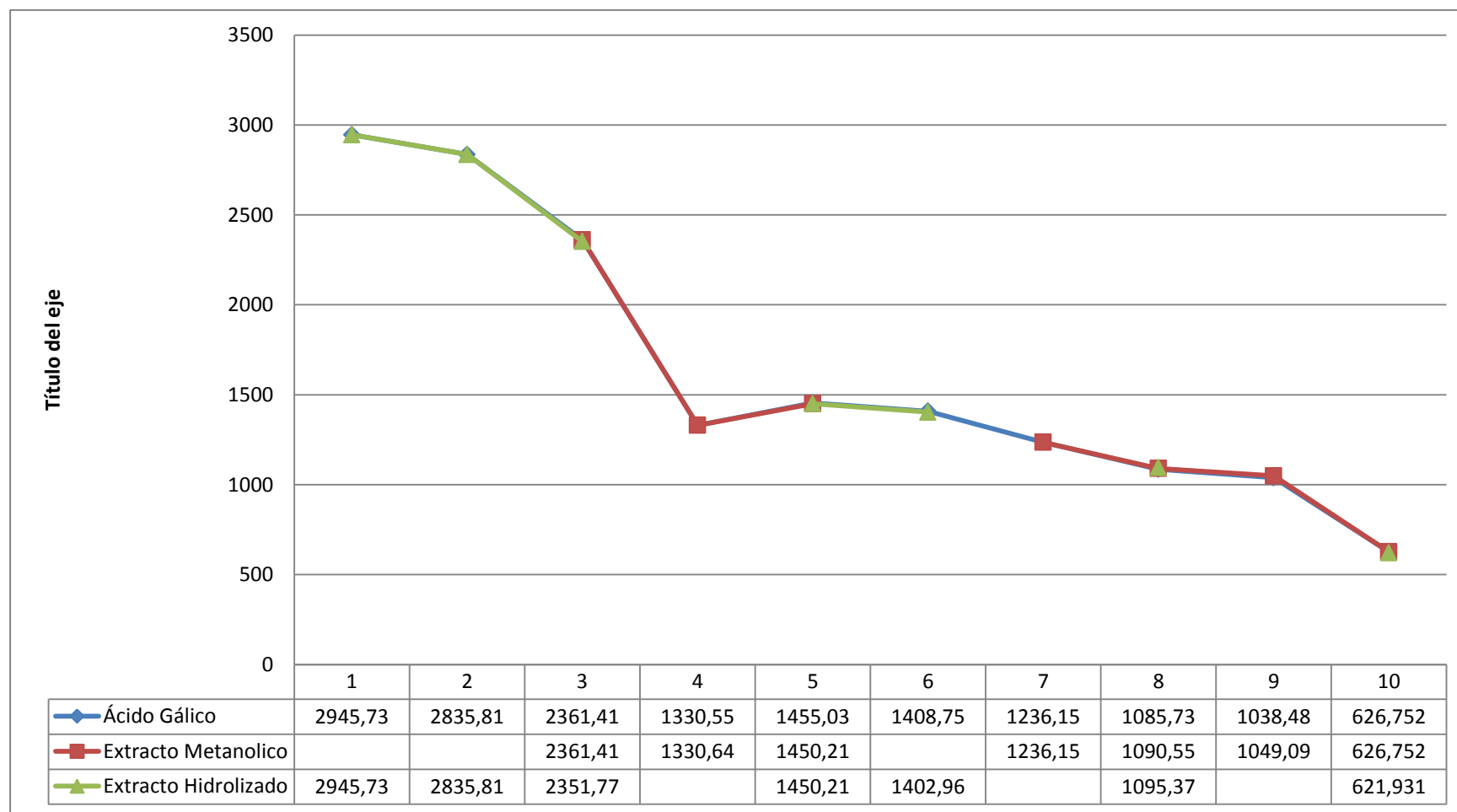
Se eliminó los picos encontrados en el ácido gálico, extracto metanólico e hidrolizado que correspondían al metanol. Se dejó únicamente los picos semejantes entre el estándar y los extractos, con lo que podemos observar cierta similitud entre los mismos, con lo cual podemos aseverar nuevamente que en los extractos de *Brownea ariza* Benth existen compuestos de tipo fenólico. (HARINDER, P. 2003, p 10)

Cuadro 3- 23 Comparación entre los números de onda encontrados en el ácido gálico y los extractos metanólico e hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

Ácido Gálico cm ⁻¹	Extracto Metanólico cm ⁻¹	Extracto Hidrolizado cm ⁻¹	
3336.25	3336.25	3325.64	→ Grupos aromáticos benceno/benceno
2945.73	2971.77	2945.73	→ Aldehidos
2835.81	2898.46	2835.81	→ Enlace --C=C-- aromático
1455.03	1450.21	1450.21	→ Alcoholes
1085.73	1049.09	1095.37	→ Benceno para-sustituído
882.247	877.452	887.095	

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 16 Comparación entre los números de onda del ácido gálico, extracto metanólico e hidrolizado. Laboratorio de análisis instrumental. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.8. Ensayo de citotoxicidad en *Artemia salina*:

Para realizar los ensayos de citotoxicidad, aparte de las diluciones de los extractos no hidrolizado e hidrolizado, se prepararon dos blancos, el primero únicamente con el medio salino y el otro con el metanol a partir de la concentración de 125ppm hasta 1000 ppm, obteniendo como resultado una toxicidad nula.

Cuadro 3- 24 Valores del número de muertes ocasionadas por el medio salino y el metanol. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

BLANCO(AGUA DE MAR)			
Concentración ppm	Número de muertes		
0	0	0	0
0	0	0	0
0	0	0	0
BLANCO DE ALCOHOL			
Concentración ppm	Número de muertes		
125	0	0	0
250	0	0	0
500	0	0	0
1000	0	0	0

Realizado por: Cristhian Bravo

Extracto no hidrolizado

Se determinó la citotoxicidad del extracto no hidrolizado partiendo de una concentración de 62.25 ppm hasta 1750ppm, con lo que se pudo determinar que este extracto tiene una dosis letal media (DL₅₀) de 2.53468×10^3 equivalente a 2534.68ppm.

Cuadro 3- 25 Valores del número de muertes ocasionadas por extracto no hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

EXTRACTO NO HIDROLIZADO			
Concentración ppm	Número de muertes		
62.25	0	0	0
125	0	0	0
250	0	0	0
500	3	4	2

750	5	6	5
1000	6	6	5
1250	8	7	8
1500	10	10	10
1750	10	10	10

Realizado por: Crithian Bravo

Extracto hidrolizado

Se determinó la citotoxicidad del extracto hidrolizado partiendo de una concentración de 62.25 ppm hasta 1750ppm, con lo que se pudo determinar que este extracto tiene una dosis letal media (DL_{50}) de 7.71882×10^2 equivalente a 771.882ppm.

Cuadro 3- 26 Valores del número de muertes ocasionadas por extracto hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

EXTRACTO HIDROLIZADO			
Concentración ppm	Número de muertes		
62.25	0	0	0
125	0	0	0
250	0	0	0
500	2	2	3
750	4	6	5
1000	5	7	6
1250	7	8	8
1500	10	10	10
1750	10	10	10

Realizado por: Crithian Bravo

Al comparar los resultados obtenidos con las pruebas de citotoxicidad para los dos extractos, podemos notar claramente que el extracto hidrolizado es mucho más toxico que el no hidrolizado.

Cuadro 3- 27 Comparación de las DL_{50} del extracto no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

DL_{50} EXTRACTO NO HIDROLIZADO:	2534.68 ppm.
DL_{50} EXTRACTO HIDROLIZADO:	771.882 ppm.

Realizado por: Crithian Bravo

3.9. Tiempo de protrombina y tiempo de tromboplastina

3.9.1. Tiempo de protrombina TP

Determinación de los tiempos de TP de los plasmas

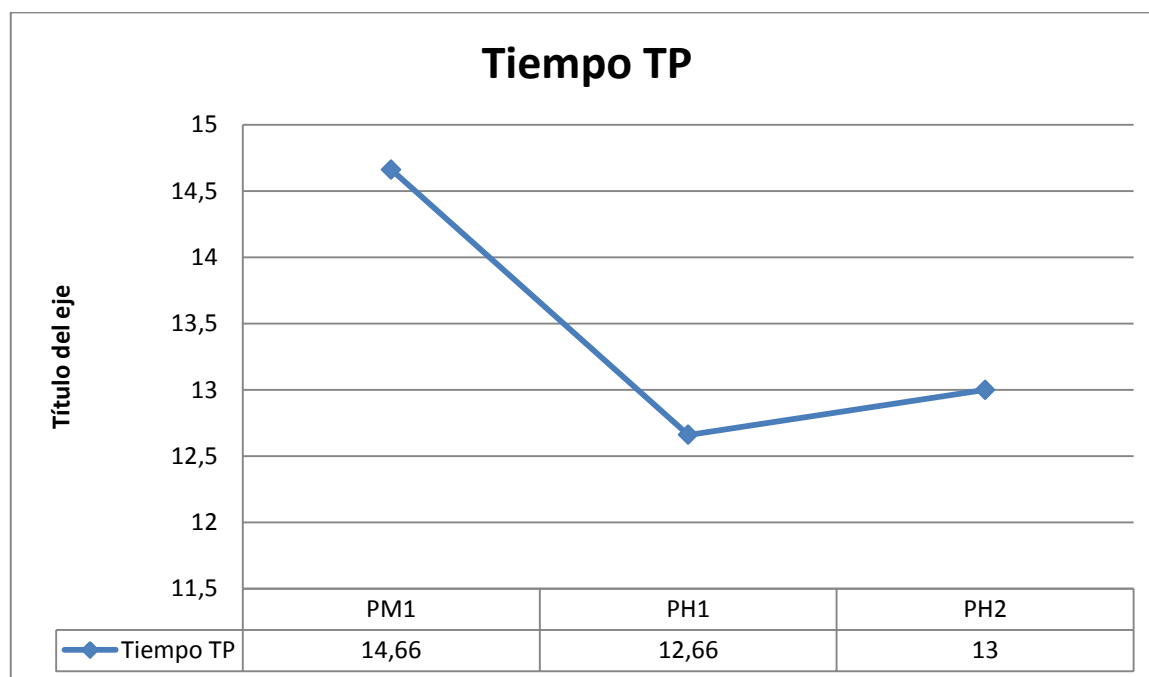
Se determinó los tiempos de protrombina normales de los plasmas en los que se realizó las pruebas, con el fin de comparar estos tiempos con los obtenidos de los extractos no hidrolizado e hidrolizado.

Cuadro 3- 28 Valores del tiempo de protrombina de los plasmas. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

TP				
Paciente	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Promedio
PM1	15	14	15	14,66
PH1	12	13	13	12,66
PH2	13	13	13	13

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 17 Valores normales de TP de los plasmas, reactivo de TP pasific hemostasis. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.9.2. Tiempo de protrombina con el extracto no hidrolizado

Se determinó el tiempo de protrombina empleando el extracto no hidrolizado a diferentes concentraciones, se partió de 0,7812 ppm a 50 ppm y se midió el tiempo que tardó en formar el coagulo de fibrina en cada solución.

Cuadro 3- 29 Valores promedio del tiempo de protrombina de los plasmas empleando el extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

TP DEL EXT. NO HIDROLIZADO			
Concentración ppm (ext. No hidrolizado)	Tiempo promedio PM1	Tiempo promedio PH1	Tiempo promedio PH2
50	17,66	17	18,33
25	16,66	15,33	17
12,5	14	14,33	14,33
6,25	11,66	12,33	12,33
3,125	9,66	9,33	8,66
1,562	4,66	4	4,33
0,7812	19,33	19,66	20

Realizado por: Cristhian Bravo

Al observar los datos se notó claramente que la concentración de extracto a la que se obtiene el menor tiempo es la de 1,562 ppm en apenas un promedio de 4,33 (± 0.33) segundos, esto puede deberse a la cantidad de proteína (albumina) en la sangre, cuyos valores de referencia son de 6,8 a 10,8 miligramos por 200 micro-litros de plasma.

Ilustración 3- 3 Anova de un Factor, Comparaciones Múltiples

25/03/2015 15:01

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

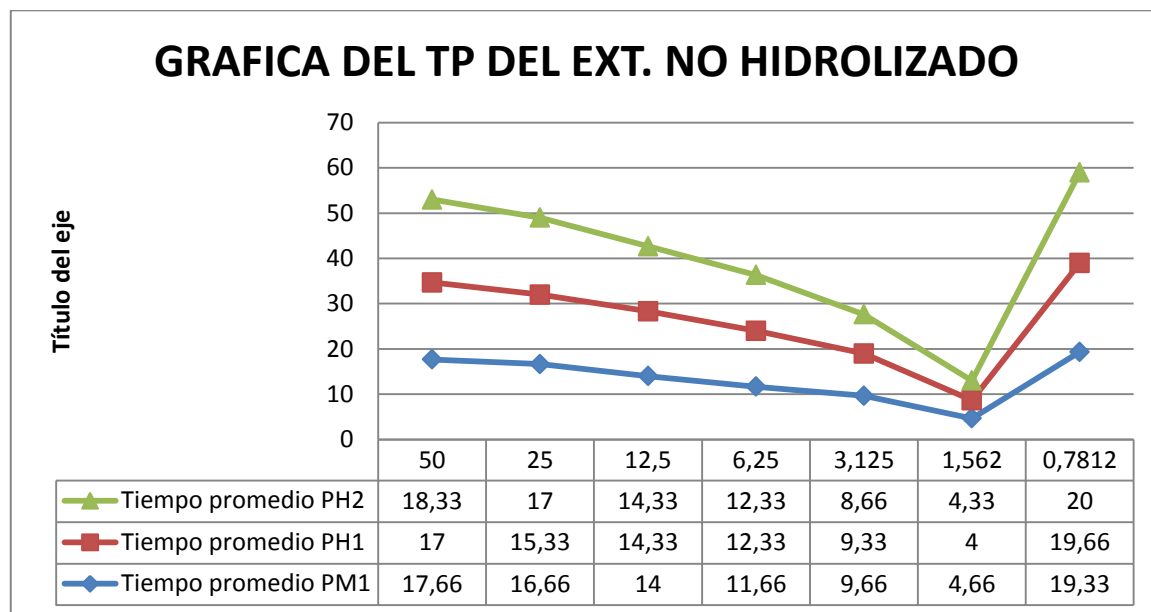
Número de Casos: 24

Método: Tukey HSD al 95.00%

	N	Media	Grupos Homogéneos
1.562	3	4.3300	X
3.125	3	9.2166	X
6.25	3	12.1066	X
Normal	3	13.4400	XX
12.5	3	14.2200	X
25 ppm	3	16.3300	X
50 ppm	3	17.6633	X
0.7812	3	19.6633	X

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 18 Valores promedio de TP de los plasmas, extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.9.3. Tiempo de protrombina con el extracto hidrolizado

Se determinó el tiempo de protrombina empleando el extracto hidrolizado a diferentes concentraciones, se partió de 0,7812 ppm a 50ppm y se midió el tiempo que tardó en formar el coagulo de fibrina en cada solución.

Cuadro 3- 30 Valores promedio del tiempo de protrombina de los plasmas empleando el extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

TP DEL EXT. HIDROLIZADO			
Concentración ppm (ext. No hidrolizado)	Tiempo promedio PM1	Tiempo promedio PH1	Tiempo promedio PH2
50	23,33	18	20
25	16	16,66	15,66
12,5	12,66	14	13,66
6,25	6,33	6,33	5,33
3,125	3,33	3	3,33
1,562	No coagula	No coagula	No coagula
0,7812	No coagula	No coagula	No coagula

Realizado por: Cristhian Bravo

Al observar los datos se notó claramente que la concentración de extracto a la que se obtiene el menor tiempo es la de 3,125 ppm en apenas un promedio de 3.22 (± 0.19) segundos, esta diferencia de concentración con relación a la del extracto anterior puede deberse a cierta influencia de los flavonoides, los mismos que en resultados anteriores se demostró que están en el extracto no hidrolizado.

Ilustración 3- 4 Anova un factor, Comparaciones Múltiples

25/03/2015 16:54

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

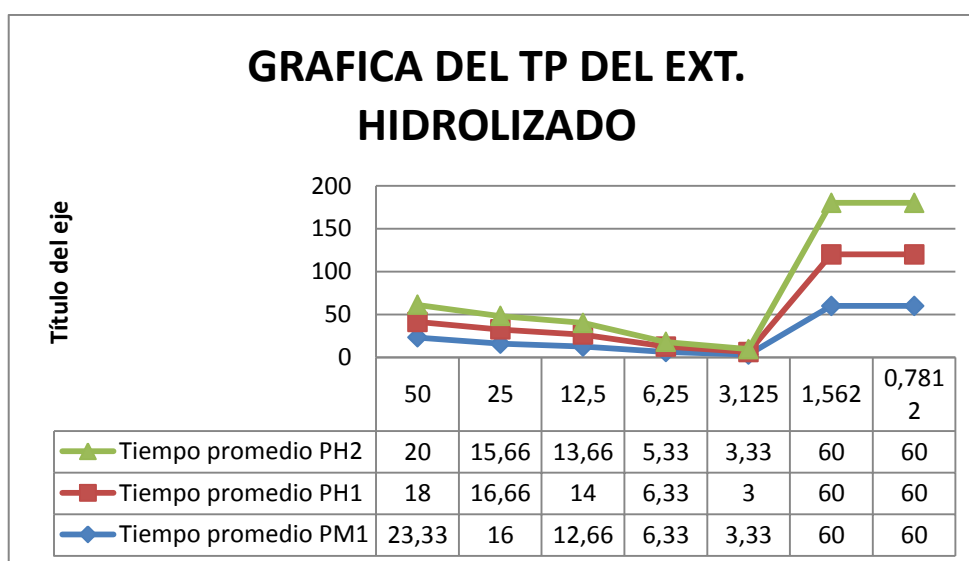
Número de Casos: 24

Método: Tukey HSD al 95.00%

	N	Media	Grupos Homogéneos
3.125 ppm	3	3.2200	X
6.25 ppm	3	5.9966	X
12.5 ppm	3	13.4400	X
Normal	3	13.4444	X
25 ppm	3	16.1066	X
50 ppm	3	20.4433	X
1.562 ppm	3	52.6666	X
0.7812 ppm	3	82.6666	X

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 19 Valores promedio de TP de los plasmas, extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.9.4. Tiempo de tromboplastina TTP

Determinación de los tiempos de TTP de los plasmas

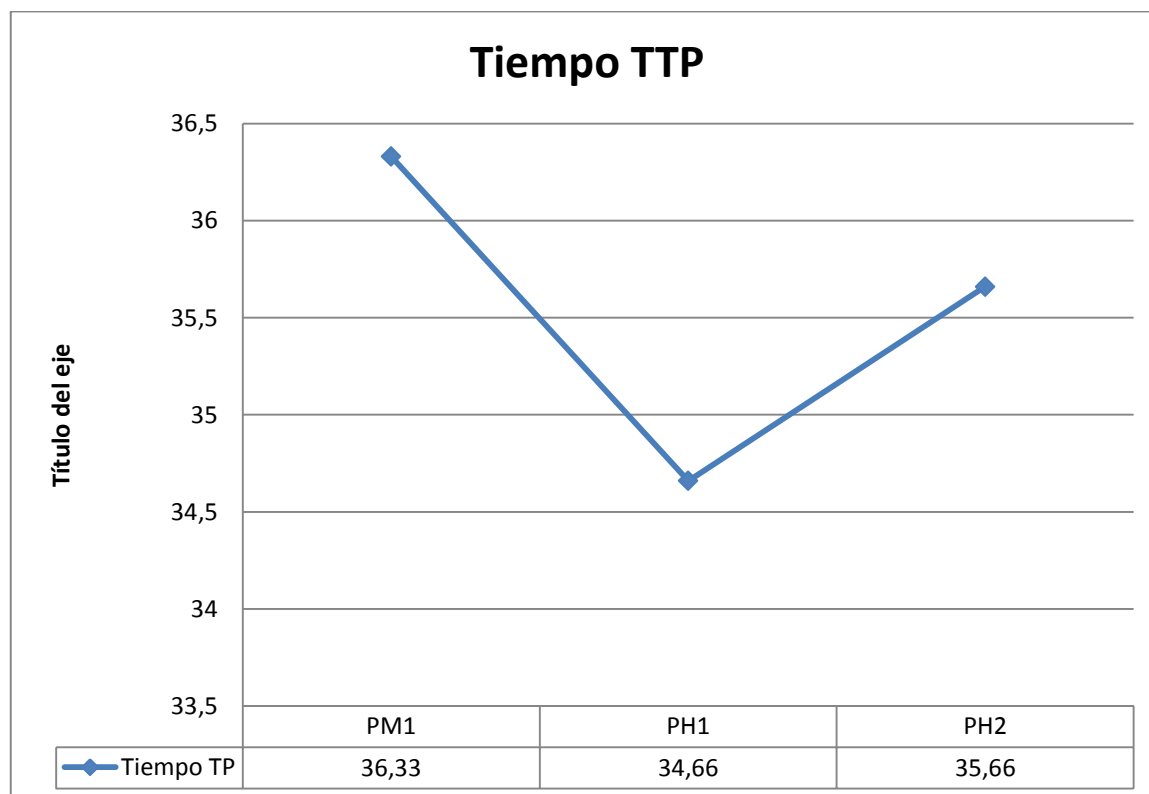
Se determinó los tiempos normales de tromboplastina de los plasmas, con el fin de comparar estos tiempos con los de los extractos no hidrolizado e hidrolizado.

Cuadro 3- 31 Valores del tiempo de tromboplastina de los plasmas. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

TTP				
Paciente	Tiempo 1	Tiempo 2	Tiempo 3	Promedio
PM1	36	37	36	36,33
PH1	34	35	35	34,66
PH2	36	35	36	35,66

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 20 Valores normales de TTP de los plasmas, reactivo de TTP Pasific hemostasis. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.9.5. Tiempo de tromboplastina con el extracto no hidrolizado

Se determinó el tiempo de tromboplastina empleando el extracto no hidrolizado a diferentes concentraciones, se partió de 0,7812 ppm a 50ppm se midió el tiempo que tardó en formar el coagulo de fibrina en cada solución.

Cuadro 3- 32. Valores promedio del tiempo de tromboplastina de los plasmas empleando el extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Epoch. Octubre 2014

TP DEL EXT. NO HIDROLIZADO			
Concentración ppm (ext. No hidrolizado)	Tiempo promedio PM1	Tiempo promedio PH1	Tiempo promedio PH2
50	31,33	30	30,33
25	20,33	19,66	20
12,5	17,33	16,33	17,66
6,25	15,66	14,33	15,33
3,125	12,33	12,33	13
1,562	9,33	8,33	9,33
0,7812	No coagulo	No coagulo	No coagulo

Realizado por: Cristhian Bravo

Al observar los datos se notó claramente que la concentración de extracto a la que se obtiene el menor tiempo es la de 1,562 ppm en apenas un promedio de 8,99 (± 0.58) segundos, esto puede deberse a que el extracto tiene las mismas características o una función semejante al cloruro de calcio 0.02M, puesto que en el ensayo este fue el reactivo que se reemplazó con las diferentes concentraciones del extracto.

Ilustración 3- 5 Anova un factor, Comparaciones Múltiples

25/03/2015 16:45
Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

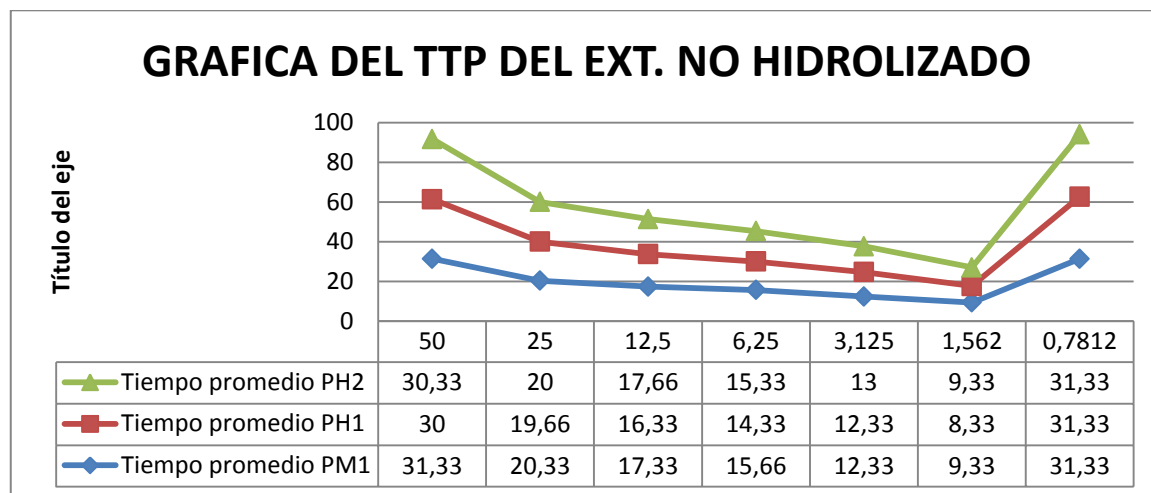
Número de Casos: 24

Método: Tukey HSD al 95.00%

	N	Media	Grupos Homogéneos
1.562	3	8.9966	X
3.125	3	12.5533	X
6.250	3	15.1066	X
12.5 ppm	3	17.1066	X
25 ppm	3	19.9966	X
50 ppm	3	30.5533	X
Tiempo normal	3	35.5555	X
0.7812	3	52.6666	X

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 21 Valores promedio de TTP de los plasmas, extracto no hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

3.9.6. Tiempo de tromboplastina con el extracto hidrolizado

Se determinó el tiempo de tromboplastina empleando el extracto hidrolizado a diferentes concentraciones, se partió de 0,7812 ppm a 50ppm y se midió el tiempo que tardó en formar el coágulo de fibrina en cada solución.

Cuadro 3- 33 Valores promedio del tiempo de tromboplastina de los plasmas empleando el extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

TP DEL EXT. HIDROLIZADO			
Concentración ppm (ext. No hidrolizado)	Tiempo promedio PM1	Tiempo promedio PH1	Tiempo promedio PH2
50	20	20,33	20,33
25	15,33	15,33	15,33
12,5	7,33	7,66	7,66
6,25	5	4,33	5,33
3,125	1,33	1,33	1,66
1,562	No coágulo	No coágulo	No coágulo
0,7812	No coágulo	No coágulo	No coágulo

Realizado por: Cristhian Bravo

Al observar los datos se notó claramente que la concentración de extracto a la que se obtiene el menor tiempo es la de 3,125 ppm en apenas un promedio de 1.44 (± 0.19) segundos, esto puede deberse a que el extracto tiene las mismas características o una función semejante a la del

cloruro de calcio 0.02M, puesto que en el ensayo este fue el reactivo que se reemplazó con las diferentes concentraciones del extracto.

Ilustración 3- 6 Anova un Factor, Comparaciones Múltiples

25/03/2015 17:02
Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

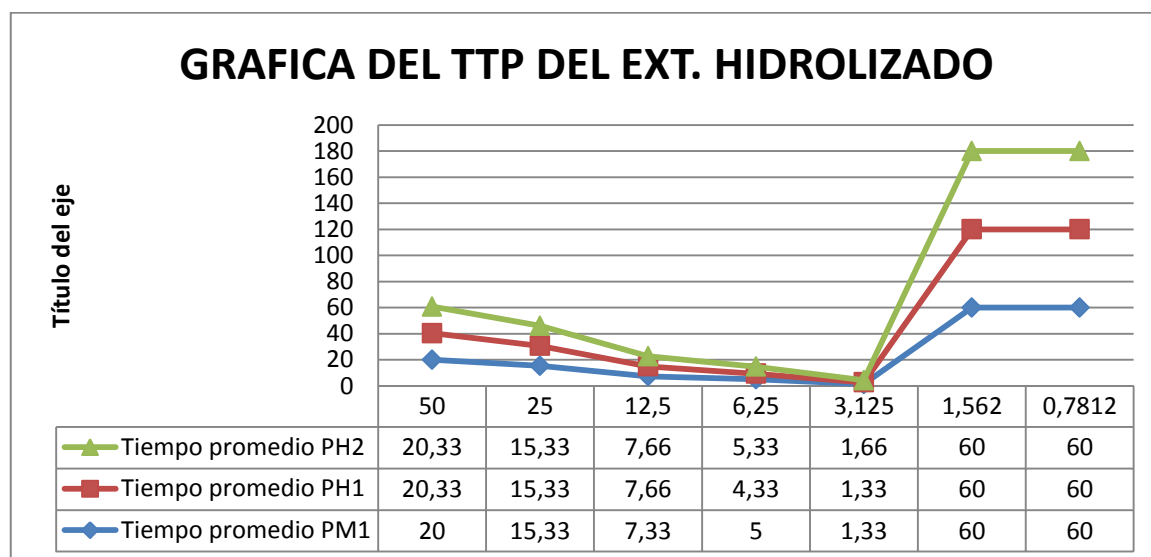
Número de Casos: 24

Método: Tukey HSD al 95.00%

	N	Media	Grupos Homogéneos
3.125 ppm	3	1.4400	X
6.25 ppm	3	4.8866	X
12.5 ppm	3	7.5500	X
25 ppm	3	15.3366	X
50 ppm	3	20.2200	X
Normal	3	35.5555	X
1.562 ppm	3	52.6666	X
0.7812 ppm	3	82.6666	X

Realizado por: Crithian Bravo

Gráfica 3- 22 Valores promedio de TTP de los plasmas, extracto hidrolizado. Laboratorio de análisis clínicos. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Crithian Bravo

Al comparar los valores de TP y TTP obtenidos con los extractos no hidrolizado e hidrolizado podemos ver una clara diferencia, por un lado en el extracto no hidrolizado a una concentración de 1,562 ppm tarda en formar el coágulo 4,33s (± 0.33) para el TP y 8,99s (± 0.58) para el TTP. Por otro lado el extracto hidrolizado requiere una concentración de 3,125 ppm para formar el coágulo en un tiempo de 3.22s (± 0.19) para el TP y 1,44s (± 0.19) para el TTP, entonces el

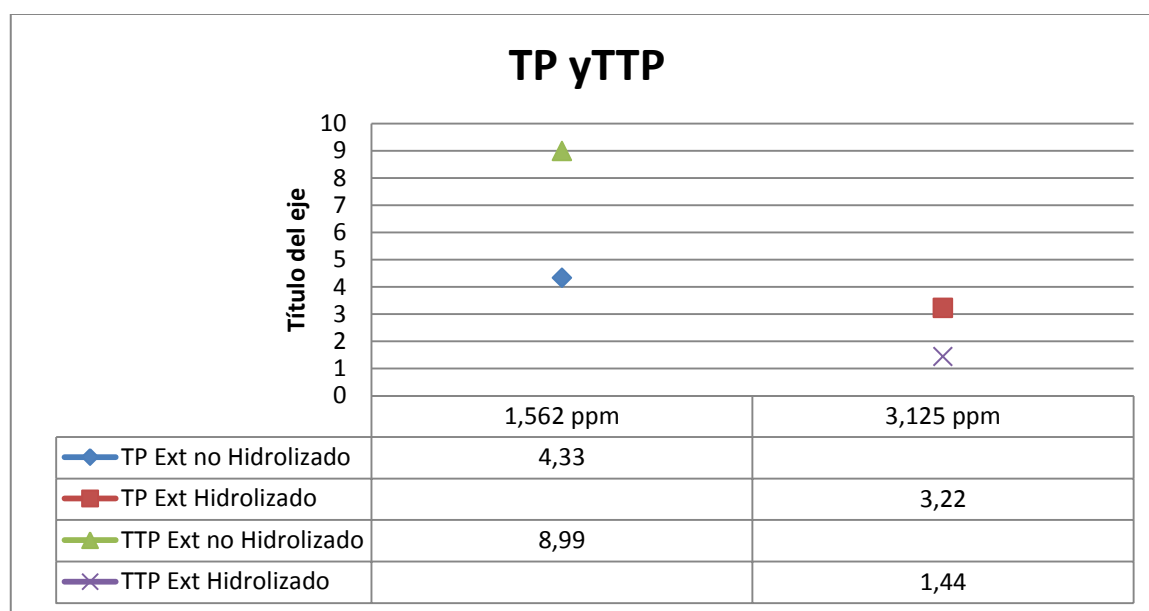
extracto hidrolizado forma el coagulo para el TP y TTP de una manera más rápida pero a una concentración mayor a la del extracto no hidrolizado.

Cuadro 3- 34 Comparación de los valores de TP y TTP del extracto no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014

	TP (V/P13.44s.)		TTP (V/P 35.55s.)	
Extracto	Concentración	Tiempo (s.)	Concentración	Tiempo (s.)
No Hidrolizado	1,562ppm	4,33	1,562ppm	8,99
Hidrolizado	3,125 ppm	3,22	3,125 ppm	1,44

Realizado por: Crithian Bravo

Gráfica 3- 23 Comparación de los valores de TP y TTP del extracto no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencias. Espoch. Octubre 2014



Realizado por: Crithian Bravo

3.10. Tiempo de sangría

Se determinó el tiempo de sangría para el extracto no hidrolizado y el hidrolizado, para esto se partió de una población de 20 personas entre hombres y mujeres, cuya edad promedio esta entre los 19 y 22 años, se dividió en dos grupos, 10 individuos para cada extracto, la concentración de estos extractos fue de 1,562 ppm para el no hidrolizado y de 3,125 para el hidrolizado.

Cada individuo fue su propio testigo, es decir se le midió el tiempo de sangría empleando suero fisiológico y posteriormente empleando el extracto.

EXTRACTO NO HIDROLIZADO 1,562 ppm

Cuadro 3- 35 Tiempos de sangría (normal y extracto no hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014

EXTRACTO NO HIDROLIZADO 1,562 ppm		
Nº Paciente	Tiempo Normal (segundos)	Tiempo Extracto (segundos)
1	80	13
2	94	30
3	80	15
4	97	16
5	80	20
6	60	8
7	90	15
8	86	15
9	75	10
10	80	20

Realizado por: Cristhian Bravo

Ilustración 3- 7 Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

25/03/2015 17:36

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

Número de Casos: 20

Método: Tukey HSD al 95.00%

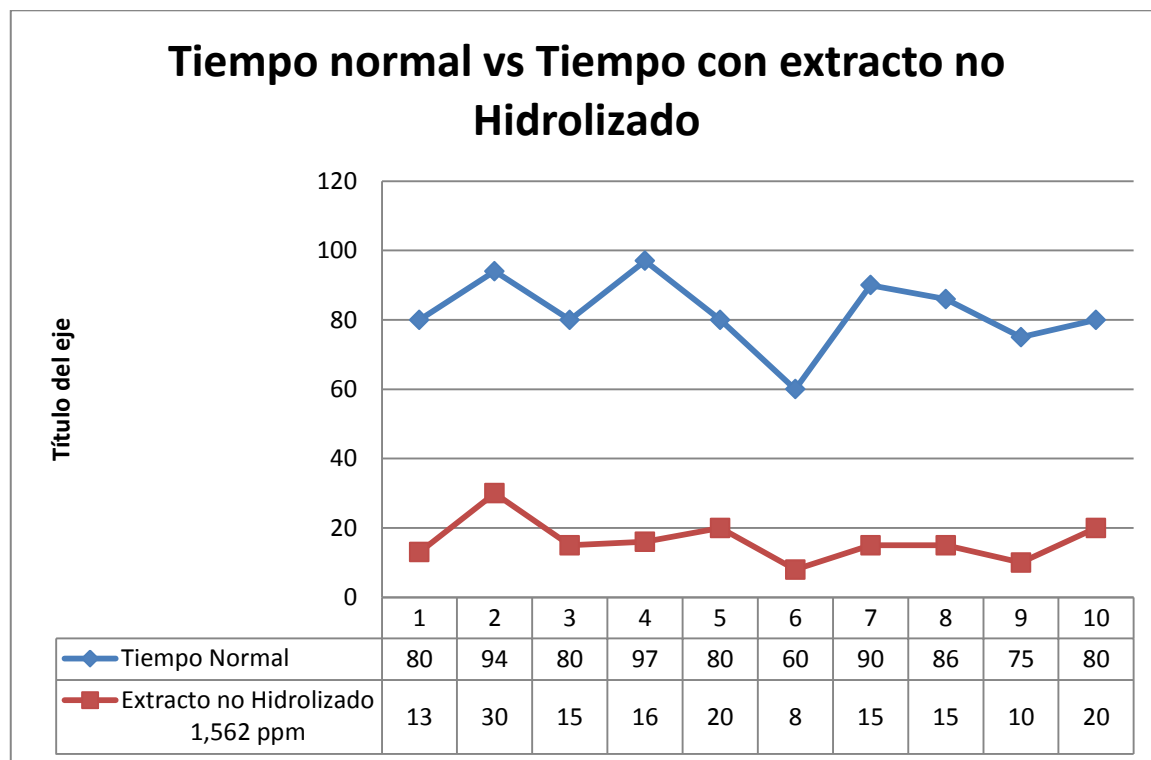
	N	Media	Grupos Homogéneos
1.156 ppm	10	16.2000	X
Normal	10	82.2000	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Normal VS 1.156 ppm	*66.0000	*8.0986

* Diferencia estadísticamente significativa.

Realizado por: Cristhian Bravo

Gráfica 3- 24 Tiempos de sangría (normal y extracto no hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014



Realizado por: Cristhian Bravo

Se puede observar claramente la diferencia de los tiempos de sangría normales y empleando el extracto, sabiendo que el promedio de los valores normales es de $82,222 (\pm 10,5282)$ segundos y el promedio del extracto no hidrolizado (1,532 ppm) es de $16,2 (\pm 6,1427)$ segundos.

EXTRACTO HIDROLIZADO 3.125 ppm

Cuadro 3- 36 Tiempos de sangría (normal y extracto hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014

EXTRACTO HIDROLIZADO 3.125 ppm		
N° Paciente	Tiempo Normal (segundos)	Tiempo Extracto (segundos)
1	80	10
2	90	12
3	75	15
4	70	15
5	85	15
6	75	15
7	80	15

8	90	10
9	85	10
10	75	13

Realizado por: Crithian Bravo

Ilustración 3- 8 Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

25/03/2015 17:38

Anova Un Factor, Comparaciones Múltiples

Número de Casos: 20

Método: Tukey HSD al 95.00%

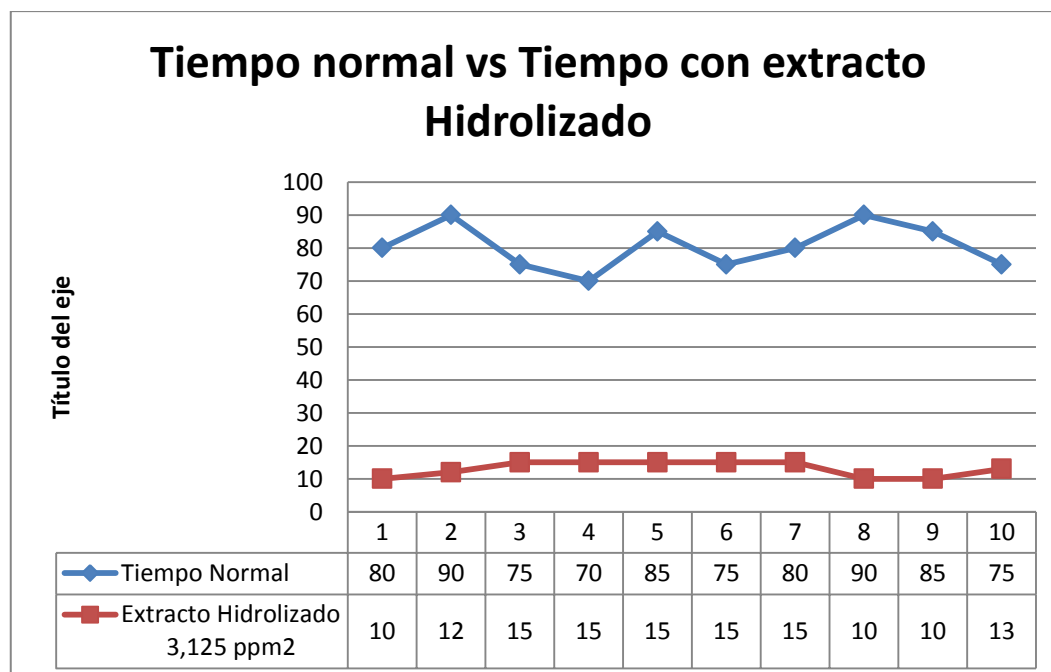
	N	Media	Grupos Homogéneos
1.156 ppm	10	13.0000	X
Normal	10	80.5000	X

Contraste	Diferencia	+/- Limite
Normal VS 1.156 ppm	*67.5000	*4.8039

* Diferencia estadísticamente significativa.

Realizado por: Crithian Bravo

Gráfica 3- 25 Tiempos de sangría (normal y extracto hidrolizado). Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014



Realizado por: Crithian Bravo

Se puede observar claramente la diferencia de los tiempos de sangría normales y empleando el extracto hidrolizado, sabiendo que el promedio de los valores normales es de 80,5 ($\pm 6,8516$) segundos y el promedio del extracto hidrolizado (3,125 ppm) es de 13 ($\pm 2,3094$) segundos.

3.10.1. Comparación de los valores obtenidos en el tiempo de sangría

Cuadro 3- 37 Comparación de los valores obtenidos en el tiempo de sangría para los extractos no hidrolizado e hidrolizado. Laboratorio de productos naturales. Facultad de ciencia. Espoch. Diciembre 2014

Tiempo de sangría promedio (20 individuos)	81,35 (± 8.69) segundos
Tiempo sangría Ext. No Hidrolizado (1,532 ppm)	16.2 (± 6.14) segundos
Tiempo sangría Ext. Hidrolizado (3,125 ppm)	13 (± 2.31) segundos

Realizado por: Crísthian Bravo

Al comparar los resultados notamos lo antes expuesto, el extracto hidrolizado permite coagular en menor tiempo aunque a una concentración mayor (el doble) que la del extracto no hidrolizado.

CONCLUSIONES

Se identificó mediante el tamizaje fitoquímico que los extractos de *Brownea ariza* Benth poseen los siguientes metabolitos: grasas, aceites, esteroides, lactonas, quinonas, antocianidinas, saponinas, flavonoides y taninos de tipo pirocatecolico. A estos metabolitos se los cuantifico como compuestos fenólicos, partiendo del hecho de que se realizó un barrido inteligente encontrando que existe un compuesto cromóforo que contiene insaturaciones, probablemente aromático semejante a un compuesto fenólico.

Se realizó la cuantificación por UV obteniendo los siguientes resultados: 746,78 ($\pm 66,56$) mg expresados como fenol, 858,57 ($\pm 5,6$) mg expresados como ácido tánico y 53,08 ($\pm 1,33$) mg expresados como ácido gálico, todo esto por cada 25g de planta y empleando como solvente para fenoles: etanol: Agua (5:5) y para el ácido tánico y gálico: metanol (98%).

Se concluyó como parte del estudio fitoquímico que en los extractos de *Brownea ariza* Benth se encuentran metabolitos de estructura muy semejante a la del ácido tánico y gálico, esto se demuestra con los Rf obtenidos mediante la cromatografía en capa fina realizada al extracto hidrolizado (Rf= 0.55) y no hidrolizado (Rf= 0.525), en la cual se tomó como estándar al ácido tánico (Rf= 0.54) y gálico (Rf=0. 54) respectivamente.

Se corroboró lo concluido en la cromatografía en capa fina (TLC) con el uso del espectro infrarrojo, para esto se determinó los picos (número de onda) del solvente (metanol), extracto metanólico, extracto hidrolizado y un estándar de ácido gálico, posteriormente se eliminó los picos correspondientes al solvente y se comparó con los picos restantes con los del ácido gálico, encontrando que poseen anillos aromáticos y grupos hidroxilo propios de los fenoles.

Se demostró gracias al software Pri-probit que el extracto no hidrolizado posee una $DC_{50} = 2534.68$ ppm y el extracto hidrolizado una $DC_{50} = 771.882$ ppm, con lo que se demuestra que el extracto hidrolizado es mucho más toxico.

Se evaluó la actividad coagulante *in vitro* de los sub-extractos de *Brownea ariza* Benth, esto mediante el empleo tiempo de protrombina (TP) y tromboplastina (TTP), encontrando que el extracto hidrolizado forma el coagulo para el TP y TTP de una manera más rápida pero a una concentración mayor a la del extracto no hidrolizado.

Se evaluó la actividad coagulante *in vivo* de los sub-extractos de *Brownea ariza* Benth, esto mediante el empleo del tiempo de sangría, con lo que se puede aseverar que el extracto hidrolizado forma el tapón plaquetario de una manera más rápida pero a una concentración mayor a la del extracto no hidrolizado, y que el metabolito presente en el extracto posee una actividad semejante a la del CaCl_2 0.02M, el cual se reemplaza en este ensayo.

RECOMENDACIONES

Se recomienda que al momento de realizar la recolección de las materias vegetales para posterior identificación de especies, se recoja todas las partes de la planta necesarias para este fin.

Para realizar cuantificación de compuestos de tipo fenólico se deberá partir de extractos frescos y estos deben ser extraídos a una temperatura no mayor a 60°C, puesto que este tipo de compuestos se oxidan fácilmente y se degradan a una temperatura superior a la antes expuesta.

Al momento de utilizar el espectro infrarrojo debemos medir el pH de la solución en cuestión, sobre todo si se trata de extractos hidrolizados, puesto que el lente del IR tiene un rango de pH tolerable, el mismo que va de pH 3 a 8.

Cuando se emplee una columna con el fin de separar fases, se deberá tener en cuenta la fácil oxidación de los compuestos fenólicos, puesto que una columna que dure más de cinco días no brindara buenos resultados.

Si se desea conservar un extracto de fenoles por un tiempo prolongado, se deberá someterlo a refrigeración y en total obscuridad, en estas condiciones este tipo de compuestos no se degradaran.

BIBLIOGRAFÍA

AMÉRICO, A. Productos Naturales. Caracas-Venezuela. Ediciones de la Universidad Central de Venezuel. 1980, pp. 5-7

CLESCERI, L., et. al. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. Revista de investigacion de la Universidad Harvard. Volumen 10. 2010. Baltimore-Estados Unidos, pp. 1-9

DALMAU, A. Fisiología de la hemostasia. Universidad de Bellvitgc. 2012, pp. 4-5
http://www.scartd.org/arxiu/hemostasia_05.pdf
2014-12-28

HARINDER, M. Cuantification of tanins. United States. Springer Science+Business Media Dordrecht. 2003, pp. 7-8

LIEBM, T. Comparación del porcentaje del extracto tánico de la corteza y de la madera de encino. Quito-Ecuador. 2004, pp. 3-8
http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_I080_Q.2004.pdf
2014-12-10

MARIA, J. Hemostasia y trastornos hemorrágicos, servicio de hematología y hemoterapia. Hospital Universitario Dr. Peset. Valencia-España. 2011, pp. 5-10
<http://www.Hemostasia y trastornos hemorrágicos, servicio de hematología y hemoterapia.pdf>
2014-08-22

MCLAUGHLIN, et, al. Protocolo para la determinacion de LC50. Estados Unidos. Cepleanu. 1991, pp. 8-9

MEDIA, C. Cadenas agroproductivas para la conservación. México. 2011., pp. 1-12
http://www.fonag.org.ec/doc_pdf/6.2006.pdf
2015-02-16

MEEROW, A., et. al. 2010. Fundamentos de espectrofotometria. España. 2010, pp. 1-2
http://dspace.universia.net/bitstream/2024/1321/1/6_Fundamentos_de_Espectrofotometria_8269.pdf

2015-01-05

MIRANDA, M. 2006. Farmacognosia y productos naturales. La Habana- Cuba. Springer. 2006, pp. 1-6

OLEAS, N. Espectroinfraroja. Colombia. Springer. 2012, pp. 5-6
http://www.upct.es/~minaees/espectroscopia_infrarroja.pdf.

2015-02-02

ROBLES L.,et. al. Situaciones clínicas más relevantes. Trastornos de la coagulación. Valencia-España. 2010, pp. 5-10
<http://scielo.isciii.es/pdf/aue/v28n10/10ACTAS04.pdf>.

2015-02-02

SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Medellín-Colombia. Convenio Andrés Bello. 2000, pp. 1-2

TINCTORIA, C. Aprovechamiento Integral y Racional de La Tara. Bogotá-Colombia. 2011, pp. 8-9
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S156108882004000200009&script=sci_arttext

2014-12-15

VIVANCO M., et. al. Evaluacion de la actividad coagulante de Brownea ariza Benth. Quito-Ecuador. 2002, pp. 1-3
<http://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved.pdf>

ANEXOS

ANEXO A: MATERIAS PRIMAS



Por: Cristhian Bravo

ANEXO B: RECOLECCIÓN DE MATERIAS PRIMAS Y CONOCIMIENTOS ANCESTRALES



Por: Cristhian Bravo

ANEXO C: TAMIZAJE FITOQUÍMICO



Por: Cristhian Bravo

ANEXO D: TAMIZAJE FITOQUÍMICO, PRUEBA PARA SAPONINAS POSITIVA



Por: Cristhian Bravo

ANEXO E: TAMIZAJE FITOQUÍMICO, FENOLES Y TANINOS POSITIVOS, PRUEBAS PARA ALCALOIDES NEGATIVAS



Por: Cristhian Bravo

ANEXO F: PRUEBA PARA LACTONAS Y QUINONAS POSITIVA



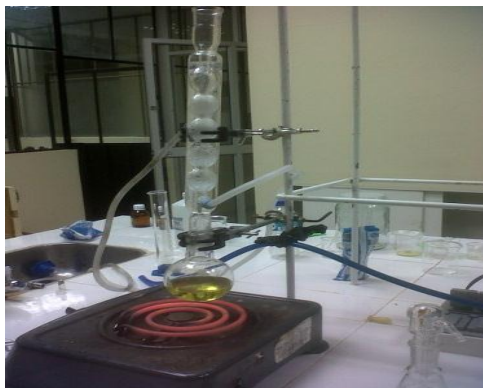
Por: Cristhian Bravo

ANEXO G: PRUEBA PARA ANTOCIANIDINAS POSITIVA



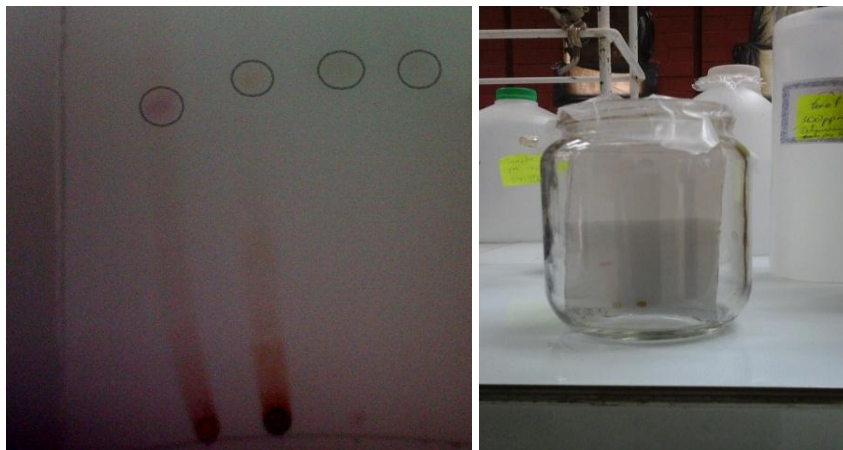
Por: Cristhian Bravo

ANEXO H: ELABORACIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEU



Por: Cristhian Bravo

ANEXO I: CROMATOGRAFÍAS EN CAPA FINA (TLC)



Por: Cristhian Bravo

ANEXO J: PRUEBAS POSITIVAS PARA FLAVONOIDES, SAPONINAS Y TANINOS EN EL EXTRACTO NO HIDROLIZADO



Por: Cristhian Bravo

ANEXO K: PRUEBAS NEGATIVAS PARA FLAVONOIDES Y SAPONINAS, POSITIVA PARA TANINOS EN EL EXTRACTO HIDROLIZADO



Por: Cristhian Bravo

ANEXO L: ESPECTROFOTOMETRÍA INFRARROJA



Por: Cristhian Bravo

ANEXO M: PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD EN *artemia salina*



Por: Cristhian Bravo

ANEXO N: TIEMPOS DE PROTROMBINA (TP) Y TROMBOPLASTINA (TTP)



Por: Cristhian Bravo

ANEXO O: CENTRIFUGA Y BAÑO MARÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE TP Y TTP



Por: Cristhian Bravo

ANEXO P: PIPETAS AUTOMÁTICAS Y DILUCIONES PARA LAS PRUEBAS DE TP Y TTP



Por: Cristhian Bravo